

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE
METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE FOSFATO
DE SITAGLIPTINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aline Ravello

Santa Maria, RS, Brasil

2010

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE FOSFATO DE SITAGLIPTINA

Por

Aline Ravanello

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração em controle e Avaliação de Insumos e produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM/RS), como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr^a Clarice Madalena Bueno Rolim

Santa Maria, RS, Brasil

2010

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
AVALIAÇÃO DE FOSFATO DE SITAGLIPTINA**

elaborada por

Aline Ravanello

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:


Clarice Madalena Bueno Rolim

(Presidenta/Orientadora)


Leandro Machado Carvalho (UFSM)


Marta Palma Alves (Unifra)

Santa Maria, 16 de Abril de 2010

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho ao Ricardo, meu melhor amigo, grande amor e companheiro de todas as horas pelo seu amor, carinho, incentivo e apoio em todos os momentos e também por ser meu grande exemplo de caráter, competência e profissionalismo.

A minha família sempre presente e dedicada, pelo incentivo e apoio em todos os momentos da minha vida.

À Professora Dr^a Clarice Madalena Bueno Rolim por me aceitar, confiar e orientar durante este período, mas principalmente por me ensinar algo pertencente à sabedoria de poucos mestres que é descomplicar a vida e perceber esta de uma maneira muito mais simples e alegre.

As minhas queridas bolsistas de iniciação científica Gabriele, Bruna e Ana que fizeram parte da minha vida neste período e demonstraram muita competência, dedicação e entusiasmo em todas as atividades desenvolvidas.

A Professora Doutoranda Cristiane Franco Codevilla pela amizade e o apoio em todos os momentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Professores Drs. Ruy Carlos Ruver Beck e Andréia Inês Horn Adams por estarem sempre dispostos a compartilharem os seus conhecimentos.

A Carminha pela sua generosidade sempre presente e contribuindo em tudo que estivesse ao seu alcance.

Aos colegas dos laboratórios de microbiologia e físico-químico pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho em especial a Marcela e a Leila que participaram ativamente para o desenvolvimento do mesmo.

Aos colegas de mestrado Felipe, Márcia e Juliana pela colaboração durante estes dois anos.

A UFSM, que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

A FAPERGS pelo apoio financeiro da bolsa de Iniciação Científica.

A CAPES pelo apoio financeiro da bolsa de mestrado.

A todos, que mesmo não citados, colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal de Santa Maria

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DE FOSFATO DE SITAGLIPTINA

AUTORA: ALINE RAVANELLO

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. CLARICE MADALENA BUENO ROLIM

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 16 de Abril de 2010.

O Fosfato de sitagliptina é um anti-hiperglicêmico oral pertencente a uma nova classe de medicamentos utilizados para o tratamento da diabetes tipo 2, os inibidores da enzima dipeptidil dipetidase-4 (DPP-4). Este medicamento além de ser seguro e bem tolerado estimula a secreção de insulina, diminui a liberação de glucagon, retarda o esvaziamento gástrico e prolonga a vida das células beta. Encontra-se comercialmente disponível na forma de comprimidos revestidos. Não existem monografias até o presente momento para a análise do fosfato de sitagliptina em sua forma farmacêutica. Neste trabalho foram desenvolvidos e validados métodos para a avaliação e quantificação do fármaco. Os métodos utilizados para a quantificação do fármaco foram a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a espectrofotometria. O sistema por CLAE foi realizado em temperatura ambiente e de maneira isocrática com coluna de fase reversa Phenomenex C18 (15cm x 4.6mm) e fase móvel composta por tampão fosfato 0.025M pH 6.8 : acetonitrila (60:40, v/v) com vazão de 0.8mL/min. A detecção foi realizada no PDA em 267nm. No método espectrofotométrico o solvente utilizado foi o HCl 0.01N e sua detecção foi realizada no comprimento de onda de 267nm. Os métodos mostram boa linearidade, precisão e exatidão e não demonstraram diferença significativa entre eles. Posteriormente foram realizados testes de dissolução com resultados semelhantes com medicamentos de diferentes lotes.

Palavras-chaves: fosfato de sitagliptina; cromatografia líquida de alta eficiência; espectrofotometria na região do ultravioleta; validação.

ABSTRACT

Masters' Degree Dissertation
Pharmacy Post-Graduation Program
Universidade Federal de Santa Maria

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODOLOGY TO EVALUATE SITAGLIPTIN PHOSPHATE

Author: ALINE RAVANELLO

Adviser: Prof. Dr^a. CLARICE MADALENA BUENO ROLIM

Local and date: Santa Maria, April 16th 2010.

Sitagliptin Phosphate is an oral anti-hyperglycemic belonging to a new class of medicine used in type 2 diabetes treatment, the dipeptidyl dipetidase -4 (DPP-4) enzyme inhibitors. This drug besides being safe and tolerated, stimulates the insulin secretion, lowers the glucagon release, delays the gastric emptiness and increases beta cells' life. It is commercially available as covered pills. So far, there is not any monograph to analyze sitagliptin phosphate in its pharmaceutical form. In this work some methods were developed and validated to evaluate and quantify the drug. The methods used to quantify it were high pressure efficiency liquid chromatography (HPLC) and spectrophotometry. The system through HPLC was carried out in room temperature and in an isocratic way with Phenomenex C 18 (15 cm x 4.6mm) reverse phase column and the mobile phase composed by 0.025M pH 6.8 phosphate buffer: acetonitril (60:40, v/v) with 0.8 mL /min. flow. The detection was accomplished in PDA in 267nm. With the spectrophotometric method the solvent used was HCl 0.01N and its detection was accomplished in 267nm wave length. The methods show a good linearity, precision and accuracy and having no significant difference between them. Later, some dissolution tests were carried out with different batches of drug and with similar results.

Key-words: sitagliptin phosphate; high efficiency liquid chromatography; spectrophotometry in the ultra-violet region; validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da sitagliptina	12
Figura 2 - Espectro de RMN ¹ H do fosfato de sitagliptina SQR (400 MHz, D ₂ O).....	25
Figura 3 – Estrutura química do fosfato de sitagliptina marcada com as letras referentes aos deslocamentos de hidrogênio obtidos com o RMN ¹ H.....	26
Figura 4 – Espectro de RMN ¹³ C do fosfato de sitagliptina SQR (400 MHz, D ₂ O).....	27
Figura 5 – Estrutura química do fosfato de sitagliptina SQR e atribuições dos deslocamentos de carbono obtidos com RMN ¹³ C.....	27
Figura 6 – Espectro de absorção de 100 µg/mL de sitagliptina (SQR), realizado de 200 a 400 nm em HCl 0.01 M.....	29
Figura 7 – Espectro da solução do fosfato de sitagliptina SQR, na concentração de 50µg/ml, obtido por DAD. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex® RP ₁₈ (150mm, 4mm, 5µm); fase móvel tampão fosfato pH 6.8 / acetonitrila (60:40); vazão 0.8 mL/min; volume de injeção: 20µL.....	30
Figura 8 – Cromatograma obtido com a solução de fosfato de sitagliptina SQR, na concentração de 50µg/mL. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex® RP ₁₈ (150mm, 4mm, 5µm); fase móvel tampão fosfato pH 6.8 / acetonitrila (60:40); vazão 0.8 mL/min; volume de injeção: 20µL.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições experimentais utilizadas no método analítico por cromatografia líquida.....29

Tabela 2 – Análise de variância dos teores obtidos na determinação do fosfato de sitagliptina em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.....67

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Diode array detector
DMID	Diabete melito insulino-dependente ou diabete tipo I
DMNID	Diabete melito não-insulino-dependente ou diabete tipo II
DPP-4	Dipeptidil peptidase IV
FDA	Food and Drug Administration
GIP	Polipeptideo insulino-trópico dependente de glicose
GL	Graus de liberdade
GLP-1	Peptídeo 1
ICH	International Conference on Harmonisation
IR	Infravermelho
MK - 0431	Fosfato de sitagliptina
r	Coefficiente de correlação de Pearsons
RMN	Ressonância magnética nuclear
r.p.m	Rotações por minuto
SQR	Substância química de referência

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivos Gerais.....	13
2.2 Objetivos Específicos.....	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 Considerações gerais.....	14
3.2 Mecanismo de ação	15
3.3 Estrutura química	16
3.4 Farmacocinética	16
3.5 Reações adversas	17
3.6 Validação.....	18
3.7 Métodos de Determinação.....	18
3.8 Dissolução	20
4 CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)	24
4.1 Introdução	24
4.2 Substância Química de Referência	24
4.3 Identificação da SQR	25
4.3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H (RMN ¹ H)	25
4.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C (RMN ¹³ C)	26

4.3.3 Espectroscopia na região do ultravioleta	28
4.3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	29
5 ARTIGOS CIENTÍFICOS	31
5.1 Artigo 1	31
5.2 Artigo 2	45
6 DISCUSSÃO	63
6.1 Discussão Geral.....	63
6.2 Método espectrofotométrico	63
6.3 Método Cromatográfico.....	65
6.4 Análise comparativa entre os dois métodos validados	67
6.5 Dissolução.....	68
7 CONCLUSÕES	70
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
9 ANEXOS.....	82
9.1 Artigo Aceito.....	82
9.2 Artigo Submetido.....	83

1 INTRODUÇÃO

O diabetes melito é um distúrbio metabólico crônico, caracterizado por níveis elevados de glicemia devido à deficiência de insulina, frequentemente combinada com resistência à insulina. Ocorre hiperglicemia devido à liberação descontrolada de glicose pelo fígado, e baixa captação de glicose, com reduzida síntese de glicogênio (RANG et al, 2003). As causas são desconhecidas, mas acredita-se que a hereditariedade e fatores relacionados ao estilo de vida exerçam um papel importante no seu desenvolvimento (KAPRIO et al., 1992).

A classificação “terapêutica” atualmente recomendada pela American Diabetes Association reconhece dois tipos principais de diabete: o diabete melito insulino-dependente (DMID) ou diabete tipo I e o diabete melito não-insulino-dependente (DMNID) também conhecida como diabete tipo II (KATZUNG, 1994). Segundo a Organização Mundial da Saúde, é estimado que, para o ano de 2030, 366 milhões de pessoas sejam diabéticas (WHO). O número de pessoas com diabetes está aumentando devido ao crescimento da população, envelhecimento, urbanização e aumento da prevalência de obesidade e sedentarismo. Assim, a quantificação da prevalência e do número de pessoas afetadas pelo diabetes, agora e no futuro, é importante para permitir um planejamento racional e alocação de recursos (WILD et al., 2004). O diabetes tipo II acomete de 90 a 95% dos casos e apesar de estar associada com idades mais avançadas também é diagnosticada em crianças e adolescentes. Esta forma da doença normalmente está relacionada à obesidade.

O tratamento inicial para DMNID inclui modificações no estilo de vida e a prática de atividades físicas, quando estas medidas tornam-se ineficazes, são utilizados os hipoglicemiantes orais, mas aproximadamente um terço destes pacientes acabam necessitando de insulina endógena no decorrer dos anos, devido ao declínio da função das células β (CHACRA & LERARIO, 1998; RANG et al, 2003; NATHAN et al, 2006, MIZUNO et al, 2008,).

As terapias farmacológicas possuem tolerabilidade e eficácia limitadas e diversos efeitos colaterais (MOLLER, 2001). Devido a esses fatores foi aprovado em outubro de 2006 pelo FDA um medicamento com um diferente mecanismo de ação, chamado de Januvia® (fosfato de sitagliptina), para ser utilizado como monoterapia ou em associação com outros

hipoglicemiantes orais (MSD, 2007). O fosfato de sitagliptina (Figura 1) é um fármaco que vem sendo amplamente indicado no Brasil, aprovado pela ANVISA em Outubro de 2006, para a terapia da Diabetes tipo II devido à menor frequência de efeitos colaterais, como sobrepeso e hipoglicemia e por prolongar a função das células β (REIMER et al., 2002; POSPISILIK et al., 2002; AHREN et al., 2004; DRUKER & NAUCK, 2006; DHILLON, 2010). No mercado brasileiro encontra-se disponível na forma farmacêutica de comprimidos revestidos nas dosagens de 25mg, 50mg e 100mg e também encontra-se em associação com o cloridrato de metformina com o nome comercial de janumet®.

Considerando o exposto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver e validar metodologias analíticas para avaliação do fosfato de sitagliptina em sua forma farmacêutica, cujos resultados estão dispostos na forma de artigos científicos. Com os resultados obtidos na avaliação por espectrofotometria e o desenvolvimento do perfil de dissolução do fármaco elaborou-se o artigo “Development and Validation of an UV-spectrophotometric Method for the Dissolution Studies of Sitagliptin Tablets”(artigo 1), submetido para Latin American Journal of Pharmacy. O segundo artigo foi submetido ao Journal of Chromatographic Science após a obtenção dos resultados com o desenvolvimento e validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e este foi intitulado “Development and Validation of a Stability-Indicating LC Method for Determination of Sitagliptin in Tablets”.

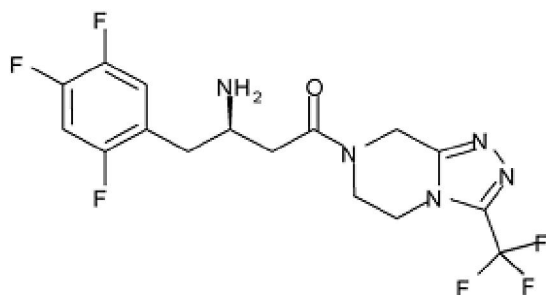


Figura 1 – Estrutura química da Sitagliptina

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Desenvolver e validar metodologias físico-químicas para a caracterização e avaliação do fosfato de sitagliptina em produtos farmacêuticos na forma de comprimidos revestidos.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa para determinação quantitativa de sitagliptina em comprimidos.
- Desenvolver e validar método por espectrofotometria no UV para determinação quantitativa de sitagliptina em comprimidos.
- Realizar estudo comparativo entre os métodos propostos.
- Desenvolver e validar método de dissolução para comprimidos revestidos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Considerações gerais

A diabetes tipo 2 (T2DM) é uma desordem metabólica geralmente decorrente da resistência periférica à ação do hormônio insulina (CHACRA & LERARIO, 1998). Essa forma da doença caracteriza-se primariamente por resistência a insulina ou redução da sensibilidade a insulina. Assim, os fatores contribuintes mais importantes no diabetes tipo 2 incluem: (a) resistência das células corporais a insulina; (b) produção hepática de glicose aumentada devido a degradação do glicogênio; (c) transporte reduzido de glicose mediado por insulina para os tecidos muscular e adiposo; e (d) função prejudicada das células β , conduzindo a não liberação de insulina em resposta a um estímulo hiperglicêmico (HAVALÉ & PALM, 2009). Com o passar dos anos um terço dos pacientes acabam necessitando de insulina devido à disfunção progressiva das células β (RANGE et al, 2003).

Em decorrência dos distúrbios metabólicos observados, surgem diversas complicações, como: coronariopatias, vasculopatias periféricas, retinopatias, nefropatias, neuropatias, depressão e problemas cognitivos (SEEMAN et al, 1994; GREEG et al, 2000; GREEG et al, 2002; MAGGI et al, 2004; BRUCE et al, 2005).

Apesar da disponibilidade de várias classes de antidiabéticos orais, a maioria dos pacientes não consegue manter os níveis glicêmicos normais, aumentando ainda mais os riscos de complicações microvasculares e macrovasculares e isto faz com que a mortalidade das pessoas com diabetes tipo 2 chegue a 75-80% devido a doenças cardiovasculares. A diabetes pode diminuir o tempo de vida de 12 a 14 anos ((INZUCCHI, 2002; MANUEL & SCHULTZ, 2004; COHEN & HORTON, 2007).

A recente descoberta da função biológica da enzima dipeptidil peptidase IV (DPP-4), uma enzima presente no intestino, estimulou pesquisas dirigidas ao desenvolvimento de agentes antidiabéticos com um diferente mecanismo de ação, os inibidores da DPP-4. A sitagliptina é um fármaco pertencente a este grupo e representa um inibidor potente, altamente seletivo e reversível da enzima DPP-4 (WEBER, 2004; MSD, 2007).

3.2 Mecanismo de ação

A enzima DPP-4 é responsável pela degradação e inativação dos hormônios incretina denominados peptídeo 1 (GLP-1) e polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP). Estes hormônios atuam na liberação da insulina em presença da glicose (HOLST & GROMADA, 2004; HANSOTIA et al, 2004).

O GLP-1 é liberado pelas células L, localizadas no íleo e no cólon e tem a função de regular os níveis de insulina e glucagon, aumentar a sobrevivência e a proliferação das células β e retardar o esvaziamento gástrico aumentando a saciedade (BAGGIO & DRUKER, 2004; BRUBAKER & DRUKER, 2004; HOLST E GROMADA, 2004). O GIP é liberado pelas células K localizadas no duodeno e no jejuno proximal e tem como função promover estoque de energia no tecido adiposo (MEIER & NAUCK, 2004). Após a liberação dessas incretinas sob o estímulo de uma refeição, as formas ativas desses hormônios ligam-se aos seus receptores nas células β pancreáticas e atenuam o aumento pós-prandial da glicose, e também contribuem para reduzir mais rapidamente as concentrações de glicose. Porém, ambos possuem meia vida curta devido à rápida inativação pela enzima DPP-4 (VISBOOL et al, 2003; MENTLEIN, 1999; DEACON et al, 1995). Devido à rápida clivagem promovida pela enzima, o uso das incretinas como agentes terapêuticos de uso oral, representa um obstáculo para o uso destas como agentes terapêutico (RACHMAN et al., 1997). Por isso as novas estratégias terapêuticas de tratamento do diabetes tipo 2 concentram-se em contornar o problema da meia-vida curta das incretinas e isso envolve o uso dos inibidores da DPP-4. Por este motivo, substâncias que tenham a capacidade de inativar a DPP-4 são consideradas uma nova alternativa para o tratamento do diabetes tipo 2 (VAN DER VEKEN et al., 2007; WEBER, 2004). Essa enzima é amplamente distribuída em vários tecidos e também existente como forma circulante solúvel no plasma, e estudos demonstraram que os hormônios incretina GLP-1 e GIP, possuem uma estrutura ideal para clivagem pela DPP-4, sendo rapidamente inativados por essa enzima (LOW et al., 1991; MENTLEIN et al., 1993).

3.3 Estrutura química

A sitagliptina, o primeiro inibidor da DPP-4 aprovado pelo FDA para o tratamento do diabetes, é descrito quimicamente como: fosfato de 7-[(3R)-3-amino-1-oxo-4-(2,4,5-trifluorfenil)butil]-5,6,7,8-tetrahidro-3-(trifluormetil)-1,2,4-triazol[4,3-a]pirazina (1:1) monoidratado. A fórmula empírica é $C_{16}H_{15}F_6N_5O \cdot H_3PO_4 \cdot H_2O$, possui um peso molecular de 523,32 e um pKa 7,7 (EMEA, 2009). A forma farmacêutica disponível é a de comprimidos revestidos, e esta contém como excipientes celulose microcristalina, hidrogenofosfato de cálcio anidro, croscarmelose sódica, estearato de magnésio e fumarato de sódio.

A sitagliptina é um pó cristalino, não higroscópico, com uma coloração que pode variar de branco a esbranquiçado. O composto é solúvel em água e N,N- dimetilformamida, discretamente solúvel em metanol, muito pouco solúvel em etanol, acetona e acetonitrila e insolúvel em isopropanol e acetato de isopropila (MSD, 2007).

3.4 Farmacocinética

Vários estudos caracterizando as propriedades farmacocinéticas da sitagliptina em animais, indivíduos saudáveis, indivíduos obesos de meia-idade e pacientes com T2DM foram publicados (HERMAN et al., 2006; BERGMAN et al. a e b, 2006; BECONI et al, 2007). Em geral, a farmacocinética da sitagliptina em indivíduos saudáveis é comparável com aquela observada em pacientes com DM2 (MSD, 2007). Após a administração oral, a sitagliptina é rapidamente absorvida, os picos de concentração plasmática ocorrem de 1 a 4 horas após a administração e a biodisponibilidade absoluta é de 87%, considerando que a co-administração com dieta rica em gorduras não teve qualquer efeito na farmacocinética, o medicamento pode ser administrado com ou sem alimento. O volume médio de distribuição no estado estacionário após a administração de uma dose intravenosa única de 100 mg de sitagliptina a indivíduos saudáveis é, de aproximadamente, 198 litros. A fração que se liga de modo reversível às proteínas plasmáticas é de apenas 38 % (EMEA, 2008). A meia vida após uma dose oral de 100 mg foi de aproximadamente 12,4 horas e a depuração renal foi de 350ml/min. O acúmulo de sitagliptina é mínimo com doses múltiplas (BERGMAN et al a, 2006; MSD, 2007).

Aproximadamente 79% do sitagliptina é excretada de forma inalterada na urina e aproximadamente 13% nas fezes. Após a administração de uma dose oral de sitagliptina, aproximadamente 16 % da radioatividade foi excretada como metabólitos. Seis metabólitos foram detectados em níveis residuais e não se prevê que contribuam para a atividade inibidora plasmática da DPP-4 (EMEA, 2007; VINCENT et al, 2007; MSD, 2007).

Em um estudo da farmacocinética da sitagliptina em pacientes com insuficiência renal, foi constatado que houve um aumento de aproximadamente 2 vezes na concentração plasmática em pacientes com insuficiência renal moderada (CrCl 30-50 mL/min), e um aumento de aproximadamente 4 vezes na concentração plasmática em pacientes com insuficiência renal severa (CrCl <30 mL/min) ou em pacientes em diálise (BERGMAN et al.b, 2006). Baseado nesses dados, para obter exposição à sitagliptina semelhante ao que ocorreria em uma paciente com função renal normal, metade e um quarto da dose seria necessária em pacientes com insuficiência renal moderada e severa, respectivamente (MSD, 2007).

3.5 Reações adversas

Nas triagens clínicas controladas, a sitagliptina foi geralmente bem tolerada, com uma incidência geral de efeitos adversos similares ao do placebo. Nenhum dos indivíduos desenvolveu reações adversas clínicas ou laboratoriais ou descontinuaram o estudo devido a alguma reação clínica adversa. Estas, quando presentes, apresentaram-se leves a moderadas, transitórias, e resolvidas sem tratamento (BERGMAN et al., 2006a).

Durante a Fase III das triagens clínicas, as reações adversas descritas foram menores do que 5% nos pacientes tratados com sitagliptina. Das reações adversas relatadas que ocorreram com maior frequência destacam-se: infecção do trato respiratório superior (6,3%), nasofaringite (5,2%) e cefaléia (5,1%). A incidência de outras reações adversas como hipoglicemia, dor abdominal, náusea e diarreia foram muito semelhantes em pacientes que receberam sitagliptina 100mg e placebo. Não foi observado aumento significativo de peso corporal a partir dos dados iniciais com a sitagliptina (MSD, 2007).

3.6 Validação

O controle de qualidade tornou-se uma ferramenta imprescindível para a indústria farmacêutica, a partir dele pode-se garantir um medicamento seguro e eficaz. A confiabilidade dos resultados do controle de qualidade de medicamentos é alcançada através da validação dos métodos analíticos (SETHI, 1999).

Conforme a resolução 899 (BRASIL, 2003), a qual dispõe de um guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, a validação deve garantir através de estudos experimentais que o método atende às exigências analíticas assegurando a confiabilidade dos resultados. Essa resolução ainda ressalta que os equipamentos devem estar calibrados e os analistas devem ser qualificados e treinados. A validação de um procedimento analítico objetiva demonstrar que o mesmo é adequado para a análise pretendida (ICH, 2005). Segundo a USP 31 (2009) a validação é um processo no qual se estabelece, através de estudos de laboratório, que as características de desempenho do método satisfazem as exigências para a aplicação analítica pretendida.

O ICH (2005) divide os métodos analíticos em quatro categorias, incluindo os testes de identificação, os testes quantitativos de impurezas, os testes para controle do limite de impurezas e os ensaios para a determinação quantitativa, para avaliar potência (teor) do fármaco ou para a verificação do perfil de dissolução de amostras específicas.

No presente trabalho a validação vai ser conduzida conforme o ICH (2005; USP 31 (2009) e Brasil (2003). Utilizando os parâmetros de validação como: especificidade, linearidade, precisão, robustez, exatidão, limite de quantificação e limite de detecção.

3.7 Métodos de determinação

Na literatura científica foram publicados alguns artigos que descrevem métodos para a determinação de fosfato de sitagliptina em matrizes biológicas como plasma e urina.

Zeng et al (2006) descreveram a determinação de MK-0431 (sitagliptina) presente no plasma humano através de cromatografia líquida de alta turbulência (HTLC) acoplada a espectrômetro de massa com o objetivo de auxiliar os ensaios clínicos. O método foi realizado utilizando uma coluna de fase reversa para a extração (Cyclone, 50 x 1mm, 60 μ m) e uma coluna para a análise de BDS Hypersil C18 (30 x 2,1mm, 3 μ m), foram empregadas quatro fases móveis, apresentando um tempo de retenção de 2,88. O método foi validado levando em consideração os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação.

Outro método utilizando cromatografia líquida de alta turbulência acoplada e espectrômetro de massas, foi apresentado por Zeng et al (2008) para a determinação da sitagliptina em urina humana com o objetivo de elucidar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de uma única dose do medicamento e doses múltiplas, e desta maneira dar suporte aos estudos clínicos do fármaco. Foram utilizadas as mesmas colunas do estudo realizado no plasma e duas fases móveis, em diferentes proporções e fluxos, de acordo com as fases de extração e separação da substância. O método proposto demonstrou ser sensível preciso e exato.

Em 2007, Liu et al caracterizaram dois metabólitos cíclicos da sitagliptina provenientes da urina de cachorro. Esta análise foi realizada através de espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear. A purificação dos metabólitos M2 e M5 ocorreu através de uma extração em fase sólida e cromatografia líquida de alta eficiência.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, TANG et al. 2009, validou um método para determinação de sitagliptin utilizando uma coluna C18 (150mm, 4.6mm, 5 μ m), fase móvel com metanol 0,1% : solução de ácido perclórico (32:68), com um fluxo de 1.0 ml/min e detecção em 268nm, descrevendo o método como seletivo, exato e reprodutível.

3.8 Dissolução

A evolução tecnológica no desenvolvimento e produção de medicamentos exige o cumprimento de diretrizes regulamentadas para prevenir os riscos na qualidade e segurança dos produtos. A garantia da qualidade é um importante aspecto a ser considerado desde o projeto até a liberação do produto ao consumidor, sendo o seu cumprimento fiscalizado pelos órgãos oficiais que exigem que as empresas produtoras realizem ensaios de controle de qualidade em todas as fases do processo de fabricação. Os estudos de dissolução *in vitro* constituem um dos instrumentos essenciais para avaliação das propriedades biofarmacotécnicas das formulações (SKOUG et al., 1997).

A dissolução pode ser resumidamente definida como o processo pelo qual um fármaco é liberado de sua forma farmacêutica, tornando-se disponível para ser absorvido pelo organismo. Alguns autores definem como a quantidade de um fármaco, que a partir de um estado sólido, passa a solução por unidade de tempo, sob interface líquido/sólido, com temperatura e composição do solvente padronizados (CHOWDARY & RAJYALAKSHMI, 1987).

O perfil de dissolução relaciona a porcentagem de fármaco dissolvido em função do tempo (ABDOU, 1989) e representa uma técnica relativamente rápida e barata para avaliar formas farmacêuticas sólidas antes do teste clínico. Permite, também, a obtenção de parâmetros cinéticos, que são importantes para determinar a velocidade e eficiência do processo, além do tempo necessário para que determinadas porcentagens do fármaco se dissolvam, possibilitando, desta forma, conclusões a respeito das características biofarmacotécnicas *in vitro* de determinada formulação (STORPIRTIS, 1999).

A absorção de fármacos a partir de formas farmacêuticas sólidas, administradas por via oral, depende de sua liberação, da dissolução ou solubilização dos mesmos em condições fisiológicas e da permeabilidade das membranas do trato gastrointestinal. Portanto, a dissolução *in vitro* é fundamental para se prever o desempenho *in vivo* do fármaco. A dissolução nos líquidos do trato gastrointestinal é um passo limitante para que formas farmacêuticas sólidas e sólidos dispersos/suspensos em líquidos sejam capazes de transpor membranas biológicas e exercer seus efeitos clínicos, pois a rapidez do processo de

dissolução pode afetar a velocidade e extensão da absorção de fármacos e conseqüentemente sua atividade farmacológica (SHARGEL, et al., 2005).).

O estudo do processo de dissolução *in vitro*, empregando-se o teste de dissolução e perfil de dissolução tem sido utilizado como parâmetro crítico para determinar o desempenho e definir a qualidade da forma farmacêutica, servindo também como indicador preditivo da velocidade de absorção. A possibilidade de correlacionar os dados *in vivo* e *in vitro* é de valor inestimável para definir a qualidade biofarmacêutica de um medicamento, sendo útil no desenvolvimento de formulações, controle de qualidade e determinação de equivalentes farmacêuticos.

As inúmeras variáveis que podem interferir nos resultados de um ensaio de dissolução podem ser dependentes do sólido a ser dissolvido, do meio de dissolução ou relacionados ao processo de fabricação. Todos devem ser considerados, porém alguns devem ser rigorosamente monitorados para a obtenção de resultados confiáveis (STORPIRTIS, 1999; MARCOLONGO, 2003). Dentre essas variáveis citam-se:

- Relacionadas com fármaco e formulação: solubilidade, tamanho de partícula, natureza química, polimorfismo, impurezas presentes, forma farmacêutica e excipientes.
- Relacionadas com o equipamento: aparato utilizado, geometria, velocidade e vibração do sistema, posição da haste, posição e método de amostragem e dispositivo para formas farmacêuticas que flutuam.
- Relacionadas com o meio de dissolução: volume, presença de bolhas de ar, pH, evaporação do meio, temperatura, viscosidade, força iônica e tensoativos.
- Relacionados com a tecnologia de fabricação: novos métodos de preparação de formas de liberação dos fármacos permitem a inovação farmacêutica apropriada, a velocidade de liberação de se deseja.

A absorção de fármacos após administração oral, a partir de formas farmacêuticas sólidas, depende da liberação do mesmo da sua forma farmacêutica, da sua dissolução ou solubilização sob condições fisiológicas e de sua permeabilidade através do trato gastrointestinal (ANSARI, KAZEMIPOUR & TALEBNIA, 2004).

Para obter o perfil de dissolução devem-se realizar várias coletas do meio de dissolução, em tempos adequados, determinando-se a porcentagem de fármaco dissolvido a cada tempo. É importante empregar método para quantificação do fármaco previamente desenvolvido e validado. A partir da curva resultante pode-se determinar a cinética do processo de dissolução, bem como calcular diversos parâmetros, tais como o tempo de

latência da forma farmacêutica (tempo para o início do processo de desagregação) e a eficiência de dissolução (Porta *et al.*, 2002).

O teste de dissolução avalia a quantidade de fármaco dissolvido, em um determinado volume de meio, mantido a temperatura de $37,0 \pm 0,5$ °C, após determinado período de tempo, utilizando-se equipamento com dispositivo para promover agitação do meio, a uma dada velocidade de agitação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; USP 31, 2009).

Os maiores desafios encontrados no desenvolvimento do teste de dissolução são a seleção do aparato a ser utilizado e das condições que permitam a seleção de um meio discriminativo. Para realizar a escolha do meio de dissolução são utilizados critérios como o pKa, solubilidade e estabilidade do fármaco em função do pH, condições sink, bem como faixa de concentração do fármaco (MARCOLONGO, 2003; FORTUNATO, 2005).

A avaliação do perfil de dissolução, em três diferentes meios, na faixa de pH fisiológico é recomendada como suporte no desenvolvimento e otimização do método de dissolução, bem como no estabelecimento de correlações *in vivo-in vitro* (FDA, 1997; ADMS *et al.*, 2001).

Os meios de dissolução sugeridos primeiramente são água, HCl 0,1 M e solução tampão de pH 1,2 a 6,8 (FDA, 1997). Outro fator a ser considerado na escolha do meio de dissolução é a classificação biofarmacêutica do fármaco. Fármacos da Classe I, que possuem alta solubilidade aquosa e alta permeabilidade na mucosa gastrointestinal, dissolverão bem em qualquer meio aquoso, desde que não haja qualquer problema de desintegração. Geralmente esses fármacos são bem absorvidos, embora sua disponibilidade sistêmica possa ser baixa devido ao metabolismo, e o passo limitante para a absorção do fármaco é a dissolução ou o esvaziamento gástrico, se a dissolução é muito rápida. Assim, o perfil de dissolução deve ser bem definido e reproduzível para assegurar a biodisponibilidade. No estado de jejum, a taxa de esvaziamento gástrico é dependente do volume e da fase de motilidade e, dessa forma, segundo o Sistema de Classificação Biofarmacêutica, uma especificação de dissolução para formas de dosagem de liberação imediata de 85% dissolvido em menos de 15 minutos pode assegurar bioequivalência (OBERLE *et al.*, 1990).

A validação de métodos analíticos utilizados para determinação de características de desempenho, como é o caso dos testes de dissolução, deve incluir a avaliação da linearidade, precisão e exatidão, especificidade, limite de detecção e quantificação (USP 31, 2009). Dentre esses fatores, a precisão tem sido o parâmetro considerado de extrema importância para garantir a confiabilidade dos resultados (ANSARI *et al.*, 2004).

Os testes de dissolução são recomendados por compêndios oficiais para garantir a qualidade das formas farmacêuticas sólidas, mas também são empregadas para avaliar etapas de produção e desenvolvimento de novas formulações (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; FDA, 1997; USP 31, 2009)

O teste de dissolução é exigido para todas as formas farmacêuticas sólidas orais nas quais a absorção do princípio ativo é necessária para que o produto exerça seu efeito terapêutico (BRASIL, 2004).

Os testes devem ser realizados em condições tais como: método da cesta ou pá em diferentes condições de agitação (50/75/100 rpm). Para gerar um perfil de dissolução, deve-se obter, no mínimo, cinco pontos de amostragem dos quais, no mínimo três correspondam a valores de porcentagem de fármaco dissolvido menores que 65% e o último ponto seja relativo a um tempo de coleta igual a, pelo menos, o dobro do tempo anterior. Para medicamentos de dissolução rápida pode ser necessária amostragem em intervalos menores (5 ou 10 minutos) (BRASIL, 2004).

Muitos fármacos não possuem monografia oficial, e são ainda escassos na literatura estudos de desenvolvimento de métodos de dissolução. Para esses fármacos, existe a necessidade de desenvolver ensaios de dissolução que possam prever o comportamento *in vivo* dos mesmos (MANADAS et al., 2002). A avaliação do perfil de dissolução, em três diferentes meios, na faixa de pH fisiológico é recomendada como suporte no desenvolvimento e otimização do método de dissolução, bem como no estabelecimento de correlações *in vivo-in vitro* (ADAMS et al., 2001; FDA, 1997).

4. CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA DE REFERÊNCIA (SQR)

4.1 Introdução

No desenvolvimento e validação de métodos analíticos de matérias-primas e formas farmacêuticas a pureza da substância química de referência utilizada é de fundamental importância. De acordo com o FDA, existem duas categorias de SQR: compendiais e não compendiais. As compendiais, as quais são obtidas de farmacopéias (Americana, Européia, Brasileira), e não necessitam de caracterização para serem utilizadas, já as SQR não compendiais são aquelas com elevado teor de pureza, mas que devem ser cuidadosamente caracterizadas para garantir a sua identidade, potência e pureza (SWARTZ & KRULL, 1998).

Em virtude da SQR utilizada para o desenvolvimento deste trabalho ser classificada como não compendial, foram realizados testes de identificação através de diferentes análises como métodos espectroscópicos (RMN ¹H e RMN ¹³C), espectrofotométrico (ultravioleta) e cromatográfico (cromatografia líquida de alta eficiência).

4.2 Substância química de referência

A substância utilizada como referência foi o fosfato de sitagliptina matéria prima adquirida comercialmente de Sequoia Research Products, com teor declarado de 99,5%, identificada pelo lote nº 0810011430s e com validade até setembro de 2009.

4.3 Identificação da SQR

4.3.1 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN ^1H)

O espectro de RMN ^1H do fosfato de sitagliptina foi obtido em espectrômetro Bruker modelo DPX 400, registrado a 400 MHz, usando como solvente D_2O . O espectro correspondente está ilustrado na figura 2.

A análise dos deslocamentos químicos dos hidrogênios estão de acordo com a literatura (HANSEN et al., 2009). As atribuições estão indicadas na figura 3.

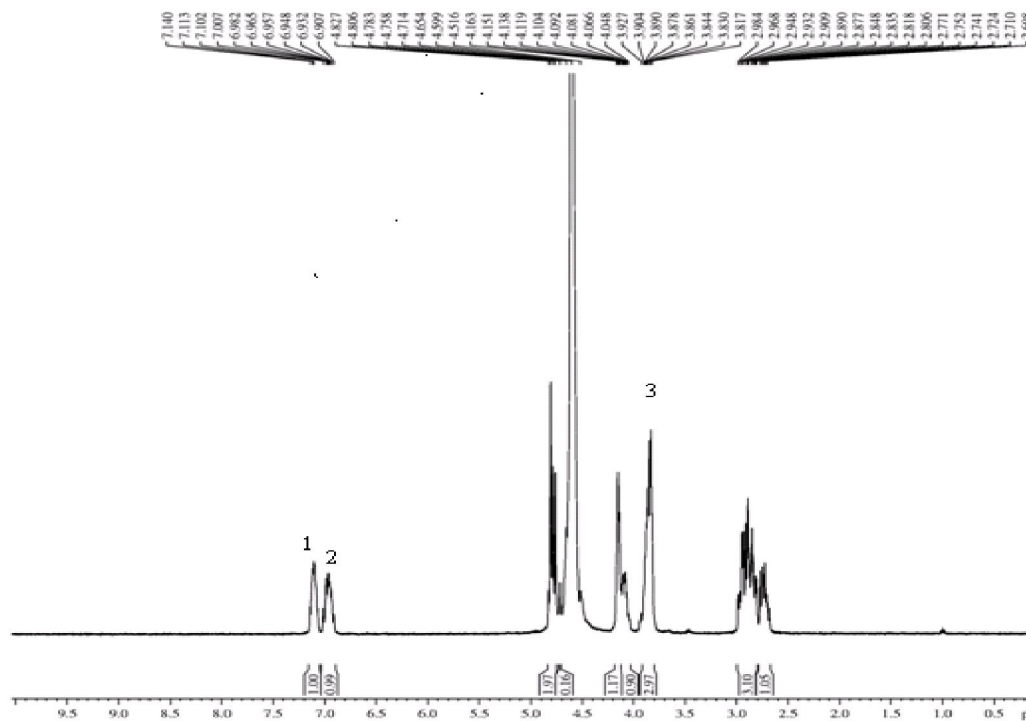


Figura 2 – Espectro de RMN ^1H do fosfato de sitagliptina SQR (400 MHz, D_2O)

Devido a complexidade da estrutura e a presença de rotâmeros não foi possível afirmar a presença de todos os hidrogênios pertencentes a estrutura química, mas os hidrogênios identificados correspondem aos H da molécula da substância química de referência. Os Hidrogênios que aparecem no espectro entre 6.90 e 7.14 correspondem aos hidrogênios localizados na região do anel aromático e o da região de 4.04 a 4.16 ao hidrogênio ligado ao carbono que faz ligação com o grupamento amina.

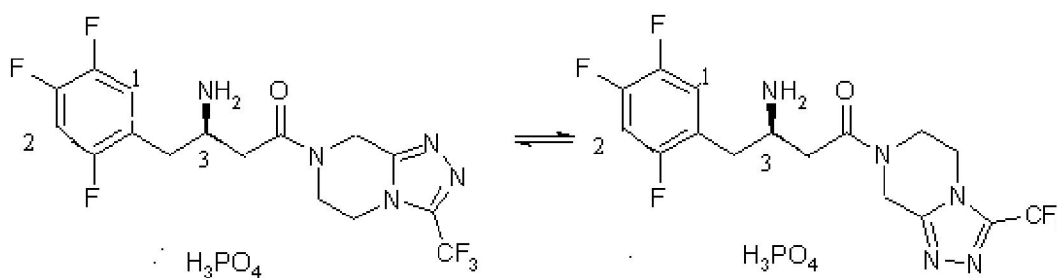


Figura 3 – Estrutura química do fosfato de sitagliptina marcada com as letras referentes aos deslocamentos de hidrogênio obtidos com o RMN ¹H.

4.3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹³C (RMN ¹³C)

O espectro de RMN ¹³C do fosfato de sitagliptina foi obtido em espectro Bruker modelo DPX 400, registrado a 400 MHz, usando como solvente D₂O. O mesmo encontra-se ilustrado na figura 4.

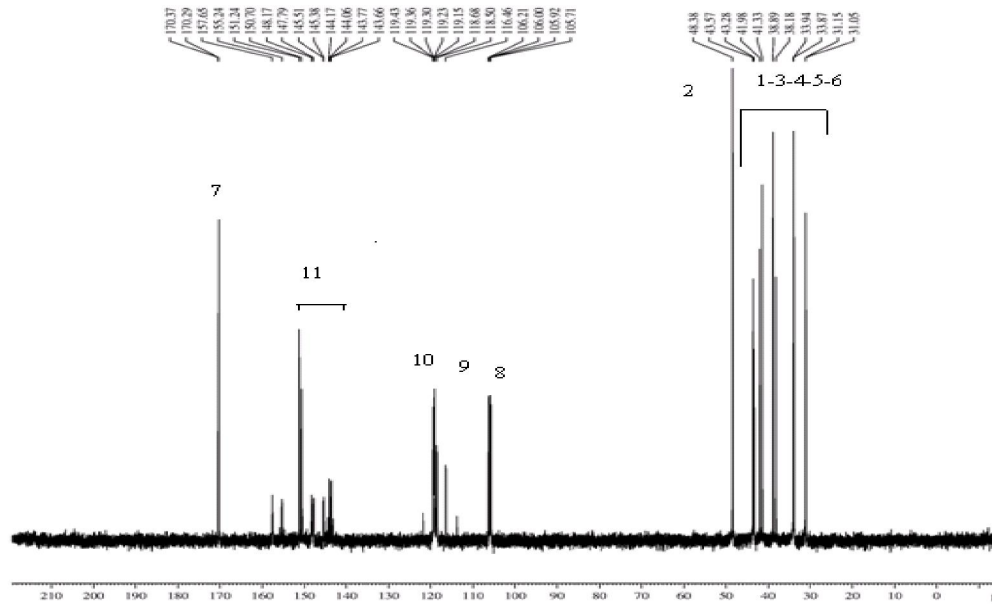


Figura 4 – Espectro de RMN ^{13}C do fosfato de sitagliptina SQR (400 MHz, D_2O)

As atribuições dos carbonos do fosfato de sitagliptina foram encontradas na literatura consultada. As mesmas foram descritas baseadas nos deslocamentos químicos encontrados na literatura pertinente e estão representadas por números na figura 5 (HANSEN et al., 2009).

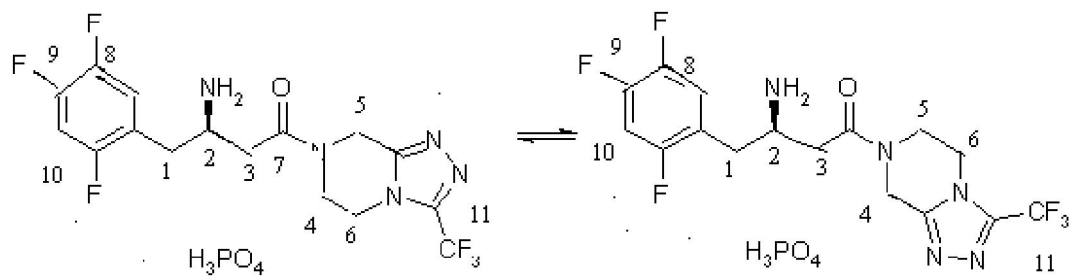


Figura 5 – Estrutura química do fosfato de sitagliptina SQR e atribuições dos deslocamentos de carbono obtidos com RMN ^{13}C .

Devido à complexidade da estrutura química e a presença de rotâmero da ligação amida existente na proporção de 4:3, vários sinais de RMN se sobrepõem, por isso a atribuição unequivoca de cada um dos rotâmeros não é possível, mas os carbonos que foram possíveis identificar caracterizaram bem a estrutura química da sitagliptina.

Os carbonos da região de 31 a 49 ppm correspondem aos 5 sinais dos carbonos alifáticos e destes o único que duplica o sinal para ambos os rotâmeros representa o carbono que faz ligação a amina. De 170.29 a 170.36 estão as carbonilas de ambos os rotâmeros, no sinal de 143.25 a 143.47 estão os carbonos ligantes ao flúor, que caracterizam muito bem a molécula e em 105 ppm e de 117-119 ppm estão os dois dubletos referentes ao acoplamento do carbono flúor do anel aromático.

4.3.3 Espectroscopia na região do ultravioleta

O espectro de absorção da solução de fosfato de sitagliptina SQR foi traçado na região de 200 a 400nm, na concentração de 100 µg/ml, diluída em água purificada, HCl, 0.01M e tampão acetado pH 4.5, em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu, modelo UV-1601PC. Foram utilizadas cubetas de quartzo de 1cm de percurso ótico e os mesmos solventes como branco.

Os espectros de absorção da sitagliptina em água purificada e em tampão acetato pH 4.5 também foram realizados e não houve diferença significativa no comprimento de onda de máxima absorção.

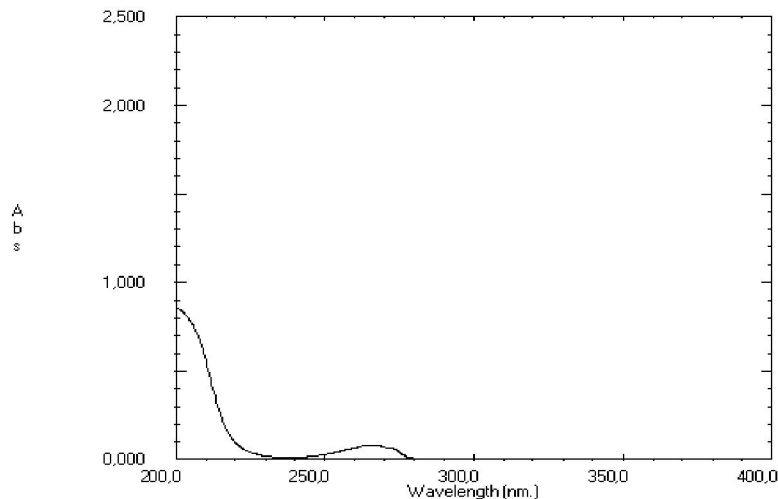


Figura 6- – Espectro de absorção de 100 µg/mL de sitagliptina (SQR), realizado de 200 a 400 nm em HCl 0.01 M.

4.3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As condições cromatográficas experimentais padronizadas encontram-se descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Condições experimentais utilizadas no método analítico por cromatografia líquida.

Características	Descrição
Coluna	Phenomenex® RP-18 (150mm x 4mm, 5µm)
Fase móvel	Tampão fosfato pH 6.8 : Acetonitrila (60:40, v:v)
Comprimento de onda	267 nm
Vazão	0.8mL/minuto
Volume Injeção	20 µl

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a líquido Shimadzu equipado com controlador de sistemas SPD-M20A. O espectro de absorção molecular, obtido

por DAD e o cromatograma obtidos com a solução de fosfato de sitagliptina SQR, na concentração de 50µg/mL estão apresentados nas figuras 8 e 9 respectivamente. A análise do pico principal, aproximadamente em 3,61 minutos, revelou um percentual de 100% de pureza, demonstrando não haver a presença de interferentes.

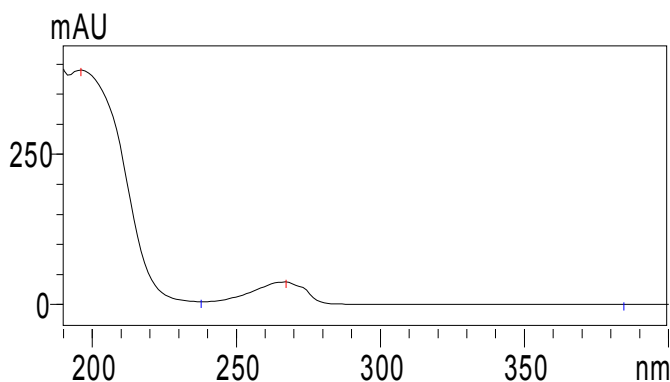


Figura 7 – Espectro da solução do fosfato de sitagliptina SQR, na concentração de 50µg/ml, obtido por DAD. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex® RP₁₈ (150mm, 4mm, 5µm); fase móvel tampão fosfato pH 6.8 / acetonitrila (60:40); vazão 0.8 mL/min; volume de injeção: 20µL

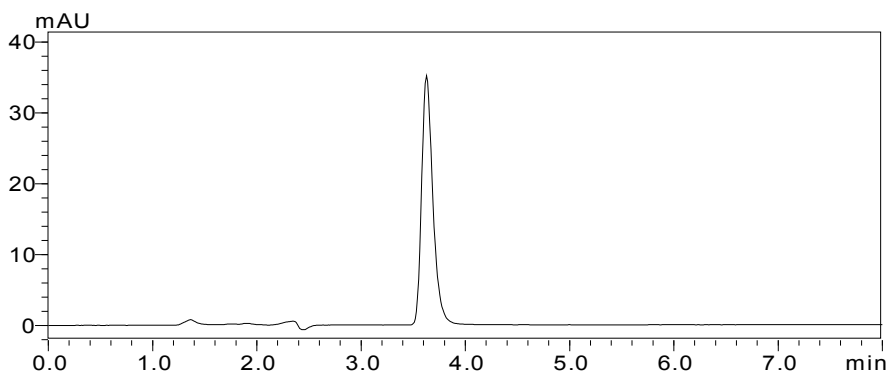


Figura 8 – Cromatograma obtido com a solução de fosfato de sitagliptina SQR, na concentração de 50µg/mL. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex® RP₁₈ (150mm, 4mm, 5µm); fase móvel tampão fosfato pH 6.8 / acetonitrila (60:40); vazão 0.8 mL/min; volume de injeção: 20µL.

5 ARTIGOS CIENTÍFICOS

5.1 Artigo 1

Development and Validation of a Stability-Indicating LC Method To Determine Sitagliptin in Tablets

Aline Ravello; Bruna G. S. Torres; Gabriele D. Souto; Felipe K. Hurtado; Ana I. P. Marcolino; Cristiane F. Codevilla; Marcela Z. Arend; Leila S. Delgado; Claudia B. Kempfer; Clarice M. B. Rolim✉.

Departamento de Farmácia Industrial e Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, 97.105-900 Santa Maria, RS, Brazil; clarice.rolim@gmail.com

Abstract

This paper describes the development and validation of an isocratic HPLC method for the assay of sitagliptin phosphate in tablets. The method employs a Phenomenex C18 column (150mm x 4.6mm I.D., 5 μ m) with phosphate buffer (pH 6.8; 0.025M): Acetonitrile (60:40, v/v) as mobile phase, at a 0.8 mL min⁻¹ flow rate and using photodiode array (PDA) detection at 267 nm. The chromatographic separation was obtained with 3.71 min retention time, and it was linear ($r = 0.9999$) in a range of 25-75 μ g mL⁻¹ with a 2.1 μ g mL⁻¹ limit of detection (LOD) and quantization (LOQ) of 6.4 μ g mL⁻¹. The method's specificity and stability-indicating capability were proved through force degradation studies. Sitagliptin was exposed to oxidative, hydrolytic and photolytic stress conditions and the samples were analyzed. The method has shown good and consistent recoveries (98.60 – 101.89%) with low intra and inter-day relative standard deviation (RSD). An experimental design confirmed that peak area was unaffected by the small changes in critical factors, in robustness study. The test solution was

found to be stable in the diluent for 48h. The validated method was successfully applied to determine sitagliptin in tablets.

Keywords

Sitagliptin phosphate, Column liquid chromatography, Stability-indicating, Method validation

Introduction

The type 2 diabetes (T2DM) is a metabolic disorder often resulting from peripheral resistance to the insulin hormone's action [1]. There is hyperglycemia due to the uncontrolled release of glucose by the liver and low glucose captivation to the muscles, decreasing the glycogen syntheses [2]. T2DM is one of the major 21st century public health challenges. According to the WHO the occurring epidemic of diabetes is strongly related to lifestyle and economic changes [3]. WHO estimates that by 2025 as many as 200–300 million people worldwide will have developed type 2 diabetes [4].

Sitagliptin phosphate, 7-[(3R)-3-amino-1-oxo-4-(2,4,5-trifluorophenyl)butyl]-5,6,7,8-tetrahydro-3-(trifluoromethyl)-1,2,4-triazolo[4,3-*a*]pyrazine phosphate (1:1) monohydrate (Fig 1) is a potent and selective oral anti-hyperglycemic reversible inhibitor of dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4), responsible for the intact incretin hormones increase. Sitagliptin is a white to off-powder and exhibits pH dependent aqueous solubility. It is soluble in water and

N,N-dimethyl formamide, slightly soluble in methanol, soluble in ethanol, acetone and acetonitrile and insoluble in isopropanol and isopropyl acetate.

The two most important incretin hormones are the glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and the glucagon-like peptide I (GLP-I). Secreted in the intestine in response to food, GIP and GLP-1 have a role in the regulation of glucose homeostasis. The activation of GIP and GLP-1 receptors on pancreatic β -cells leads to increased levels of cyclic adenosine monophosphate and intracellular calcium, with subsequent glucose-dependent insulin secretion [5]. In addition, sustained receptor activation is associated to insulin biosynthesis and stimulation of β -cell proliferation [5]. Animal and in vitro data further suggest that activation of GIP and GLP-1 receptors promotes β -cell resistance to apoptosis, proliferation, and neogenesis, resulting in enhanced β -cell function [5-6]. Some additional functions of GLP-1 include inhibition of glucagon secretion from pancreatic α -cells, resulting in decreased hepatic glucose production; slow gastric emptying; food intake suppression and glucose disposal enhancement via neural mechanisms [5-6].

To support clinical pharmacokinetic studies, a method for the determination of sitagliptin in human plasma has been developed and validated HTLC–MS/MS [7]. Sitagliptin was also determined in human urine and hemodialysate using turbulent flow online extraction and tandem mass spectrometry, a narrow bore large particle size reversed-phase column (Cyclone, 50mm×1.0 mm, 60 μ m) and a BDS Hypersil C18 column (30mm×2.1 mm, 3 μ m) were used as extraction and analytical columns, respectively [8]. Two cyclic metabolites of sitagliptin were characterized after purification from dog urine. The metabolites were characterized by hydrogen/deuterium exchange tandem mass spectrometry and NMR spectroscopy [9]. An extensive literature survey did not reveal any simple, sensitive and stability-indicating method for the determination of sitagliptin as an active substance or tablets. The pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of sitagliptin single oral doses and multiple oral doses were investigated, and urinary sitagliptin concentrations were quantified [10-11].

The aim of the present article was to develop and validate a stability-indicating reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) method for the quantitative analysis of sitagliptin phosphate in tablets. This method was validated following ICH guidelines and USP [12-13-14].

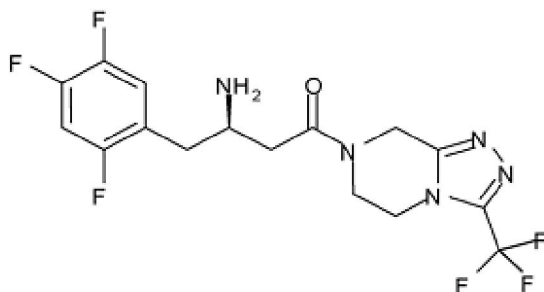


Figure 1 – Chemical structure of sitagliptina

Experimental and reagents

Sitagliptin phosphate was purchased from Sequoia Research Products (Oxford, UK). The tablets of Januvia® (Merck Sharp & Dohme) containing 100 mg of sitagliptin were obtained from commercial sources within their shelf life period. HPLC-grade acetonitrile was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Hydrochloric acid, sodium hydroxide and hydrogen peroxide were also obtained from Merck as well as analytical reagent grade potassium phosphate monobasic (Darmstadt, Germany). The water was purified with WaterPro™ PS, Labconco system (MO, USA).

Instrumentation and analytical conditions

A Shimadzu HPLC system (Kyoto, Japan) was used equipped with a CBM-20A system controller, LC-20AT pump, DGU-20A_s degasser, SIL-20A auto-sampler and SPD-M20A photodiode array (PDA) detector. An analytical separation was performed on a RP Phenomenex (Torrance, USA) Gemini C₁₈ column (150 × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size) coupled to a C₁₈ guard column (4.0 × 3.0 mm i.d., 4 μm). The choice of mobile phase was carried out through several tests with different solvents. Initially, different concentrations of acetonitrile and water (75:25, 70:30, 85:15) were tested, but there wasn't adequate separation for the sitagliptin peak. Different buffers, solutions and pHs were also tested in different concentrations with acetonitrile (buffer (0.025M) pH 3.0, phosphate buffer (0.025M) pH 6.8, triethylamine 1% pH 7.0, acetic acid 1.25% pH 4.0 and phosphoric acid (0.025 M) pH 4.0). The isocratic mobile phase chosen was a mixture of phosphate buffer 0.025M pH 6.8:

acetonitrile (60:40, v/v), which was pumped at a 0.8 mL min^{-1} flow-rate. This was filtered through a $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ nylon membrane filter (Sartorius, Germany). The injection volume was $20 \text{ }\mu\text{L}$ for both standard and samples. The detection was achieved with a PDA at 267 nm .

Reference Solution Preparation

The sitagliptin stock solution was prepared weighing 10 mg of the reference substance, then transferred into individual 100 mL volumetric flask and diluted to volume with hydrochloric acid 0.01 M to improve the sitagliptin solubility, obtaining a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ concentration. The stock solution was stored at $2\text{-}8 \text{ }^\circ\text{C}$, and daily diluted to an appropriate concentration in mobile phase.

Sample Solutions Preparation

Twenty tablets were weighed to get the average and they were ground. A quantity of the powdered tablets containing 10 mg of sitagliptin (12.85 mg sitagliptin phosphate), was transferred to 100 mL volumetric flask, 50 mL hydrochloric acid 0.01 M were added and sonicated for 10 min , and diluted to volume with the same solvent to make up to volume. This solution was stored at $2\text{-}8 \text{ }^\circ\text{C}$.

Method Validation

The method was validated using samples of tablets with sitagliptin through the determination of the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection, limit of quantitation, robustness, stability and system suitability test, following the ICH guidelines [12].

Linearity

Linearity was determined designing three analytical curves, each one with five sitagliptin concentration reference substances, in the range of $25\text{-}75 \mu\text{g mL}^{-1}$ prepared in the mobile phase. The peak areas of the chromatograms were plotted against the respective concentrations of sitagliptin to obtain the analytical curve. The results were evaluated by

linear regression analysis through the least square method to calculate calibration equation and correlation coefficient.

Detection and Quantitation Limits

The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the response and the slope using three independent analytical curves, as defined by ICH guidelines and USP [12-13-14].

Precision

Precision was determined through repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day) of the tablets sample solutions. Repeatability was conducted using six determinations at the same concentration, under the same experimental conditions. Similarly, standards were prepared and analyzed on three consecutive days for intermediate precision. The intra-day and inter-day assay RSD obtained were used to assess repeatability and intermediate precision, respectively.

Accuracy

To determine accuracy, a recovery study was performed adding known amounts of the reference standard (10, 20 and 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) to a sample solution of tablets containing 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of sitagliptin. The solutions (reference standard and sample) were placed in the same volumetric flask and diluted to volume with mobile phase.

Specificity

The stability-indicating capability of the method was determined by subjecting a reference sample solution (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) to accelerated degradation by acid, basic, oxidative and photolytic conditions to evaluate the interference in the sitagliptin quantitation. For

hydrolytic conditions, sitagliptin was dissolved in either 1 M hydrochloric acid (acid hydrolysis) or 1 M sodium hydroxide (basic hydrolysis). Both solutions were refluxed at 80 °C (8 h acid and 6 h base), cooled and neutralized with base or acid, when necessary. Oxidative condition was obtained treating the drug with 5% hydrogen peroxide at room temperature for 24 h, protected from light. Photodegradation was induced exposing samples prepared in HCl 0.01M close to ultraviolet light (280-100 nm) for 4 h. To do these samples were kept in an irradiation chamber equipped with a 30 W UV-C lamp (Philips, Holland). The selection of the degradation conditions (degradation by acid, basic, oxidative and photolytic conditions) was performed according to de ICH guidelines [12]. After treatment all the samples were diluted in 50 µg mL⁻¹ with mobile phase. Then, the stability-indicating capability of the method was established, determining the peak purity of sitagliptin in the degraded samples using a PDA detector.

Robustness

A robustness study was conducted making small but deliberate changes to the optimized method parameters, different conditions were tested, including: wavelength (264 and 270 nm), flow rate (0.7 and 0.9 mL), composition (65:35 and 55:45) and pH (6.4 and 7.2) of the mobile phase. To assess the stability of sitagliptin sample solution, the samples tested were maintained at 2-8 °C for 48h and also placed in the self sampler, at room temperature, for 48h. The mean values obtained for the determination of sitagliptin in tablets making changes in the chromatographic conditions were analyzed by ANOVA.

Results and discussion

Method development

HPLC methods have been widely employed in pharmaceutical analysis. They have gained popularity in stability studies due to their high-resolution capacity, sensitivity and specificity. In this study, a reversed-phase HPLC method was proposed to quantify sitagliptin in tablets. The mobile phase selection was based on peak parameters (symmetry, theoretical plates, capacity factor and resolution), run time, easiness of preparation and cost. A mixture of phosphate buffer pH 6.8: acetonitrile (60:40, v/v) was adopted with good peak properties. To select the best wavelength detection a PDA was used.

A typical chromatogram obtained by the proposed HPLC method, demonstrating the resolution of the symmetrical peak corresponding to sitagliptin, is shown in Fig 2a. The retention time (3.71 min) allows a fast determination of the drug, which is suitable for quality control laboratories.

Linearity

Good linearity was observed over the concentration range of 25 to 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$, with a 0.9999 correlation coefficient and the linear regression equation $y = 5227.5x + 10854$ (where x is the concentration of the sample in $\mu\text{g mL}^{-1}$ and y is the peak area).

The validity of the three analytical curves was verified by means of ANOVA, which demonstrated significant linear regression and no significant deviation from linearity ($P < 0.05$).

Detection and Quantitation Limits

The LOD and LOQ were based on the standard deviation of the intercept and the slope. LOD and LOQ achieved were 2.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 6.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

Precision

The precision evaluated as the repeatability of the method was suited calculating the relative standard deviation (RSD) for six determinations of the concentration of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ performed in the same day and under the same experimental conditions. The RSD value intra-day obtained was 0.6%.

The intermediate precision was evaluated comparing the results obtained on three different days and between analysts.

Table 1 – Inter-day and between analysts precision data of HPLC for sitagliptin in samples of tablets

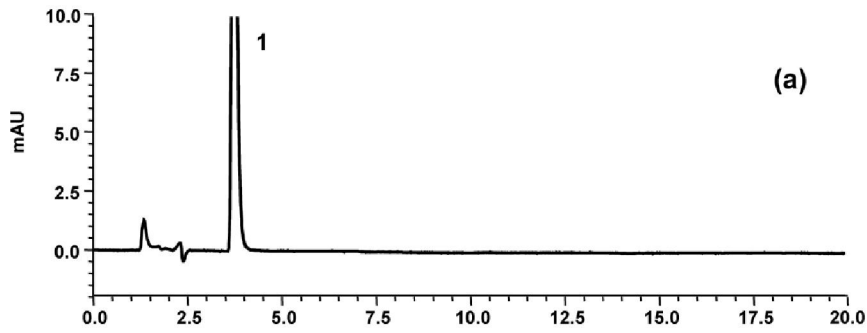
	Mean (%)	RSD (%)	Analysts	Mean (%)	RSD (%)
Day 1	92.8	0.6	A	93.1	1.2
Day 2	94.3	1.5			
Day 3	94.9	0.7	B	93.0	0.8
Inter-day precision	94.0	1.2	Mean analysts	93.0	0.1

Accuracy

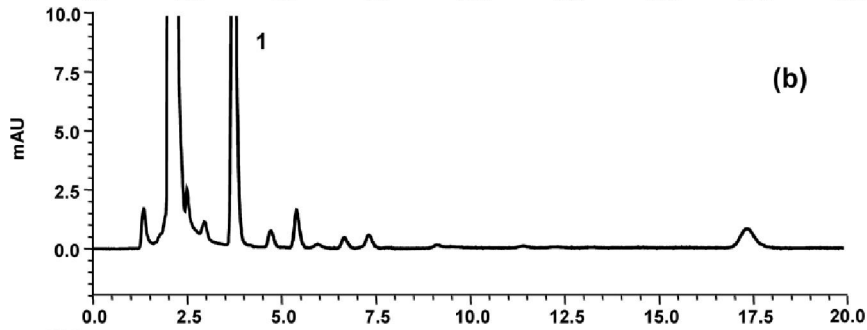
The accuracy of the method was determined by testing the recovery of sitagliptin SQR. The average recovery was 100.06% with coefficient of variation of 1.67%. The results demonstrated good accuracy of the method.

Specificity

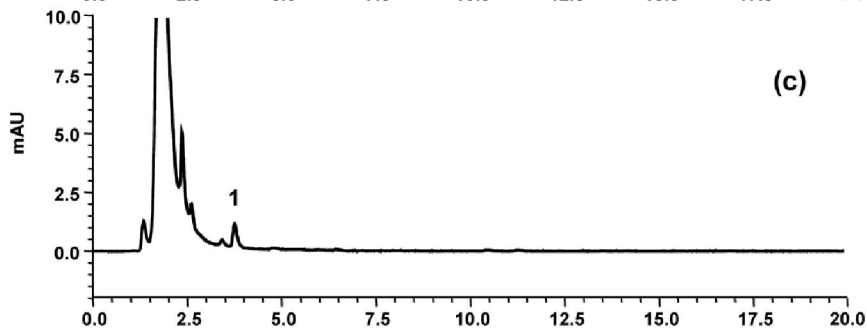
Figure 2 shows degradation of sitagliptin under various stress conditions. When submitted to oxidation the content of sitagliptin decrease about 44%, occurring several degraded products. Under UV radiation after 4 h, the drug showed 87% degradation. When the substance was exposed to acid it showed less degradation in relation to other situations reducing about 12% and the basic condition the degradation 2h was 98% and 4h was 100% with products of degradation at 11.1 min.



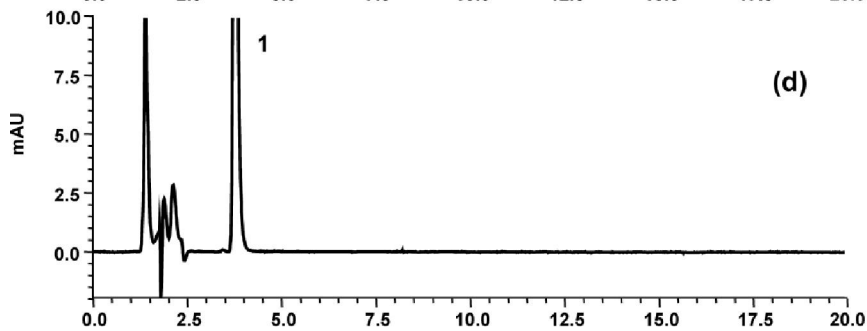
Reference standard
solution at $50\mu\text{g mL}^{-1}$



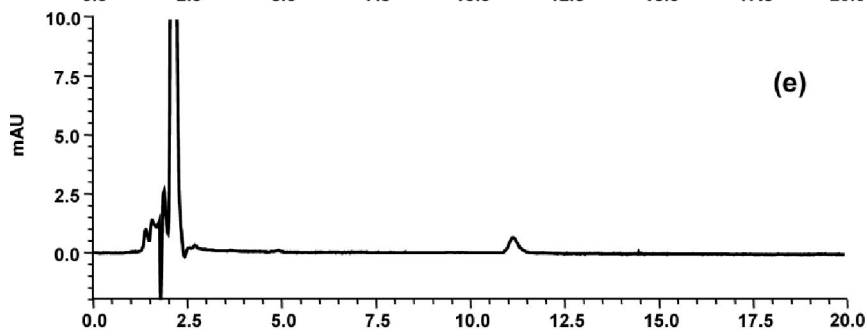
Oxidation



Photodegradation



Acid hydrolysis



Basic hydrolysis

Time (min)

Figure 2 - Chromatograms of sitagliptin (a) reference standard solution at $50\mu\text{g mL}^{-1}$; (b) after oxidation; (c) after photodegradation; (d) after acid hydrolysis; (e) after basic hydrolysis. Phenomenex C18 column (150mm x 4.6mm I.D., $5\mu\text{m}$) with phosphate buffer (pH 6.8; 0.025M): Acetonitrile (60:40, v/v) as mobile phase, at a 0.8 mL min^{-1} flow rate and using photodiode array (PDA) detection at 267 nm.

Robustness

The results and the experimental range of the selected variables evaluated are showed in table 2. Samples have been found to be stable under the conditions tested with no decrease in peak area when compared to the freshly prepared solutions, the sample solution kept at room temperature and in the refrigerator showed no significant changes, with an RSD% of 0.35 and 0.33 respectively. There were no significant changes in the method through small changes in critical method parameters, thus showing the method is robust.

Table 2 - Results of robustness study

Factor	Level	Mean % (assay n=3)	RSD%
pH of mobile phase	6.4	93.9	0.8
	7.2	94.3	1.1
Flow rate (mL min^{-1})	0.7	93.7	0.9
	0.9	93.9	1.1
Wavelength	264	93.6	1.0
	270	93.5	1.0
% acetonitrile	35	94.3	1.1
	45	94.0	1.1

Conclusion

A simple, specific, linear, precise, and accurate RP-HPLC method has been developed and validated for quantitative determination of sitagliptin phosphate in tablet formulation. The method is very simple and specific which makes it especially suitable for routine quality control analysis work, the method is stability indicating and can be used to analyze the drug and degradation products in stability tests.

Acknowledgments

The authors wish to thank the FAPERGS and CAPES for the support.

References

1. Chacra A, Lerario D, (1998). Novos avanços na terapia do diabetes tipo 2. Sociedade de cardiologia do estado de São Paulo 8: 914-22.
2. Range H, Dale M, Ritter J, Moore P (2003). O pâncreas endócrino e o controle da glicemia. Farmacologia. 5ed. São Paulo: Elsevier, 2003. Cap.25, p 440-449.
3. Centres for Disease Control. National Diabetes Fact Sheet (2002). <http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/factsheet.htm>
4. Eriksson J, Lindstrom J, Tuomiletho J (2001). Potential for the prevention of type 2 diabetes. *Br. Med. Bull.* 60: 183–199
5. Drucker D, Nauck M (2006). The incretin system: Glucagon like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet* 368:1696–1705. DOI:10.1016/S0140-6736(06)69705
6. Barnett A (2006). DPP-4 inhibitors and their potential role in the management of type 2 diabetes. *Int J Clin Pract* 60:1454–1470. DOI 10.1111/j.1742-1241.2006.01178.x
7. Bergman A, Cote J, Yi B, Marbury T, Swan S, Smith W, Gottesdiener K, Wagner J, Herman G (2007). Effect of renal insufficiency on the pharmacokinetics of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor. *Diab Care* 30: 1862–1864. DOI: 10.2337/dc06-2545
8. Zeng W, Musson D, Fisher A, Wang A (2006). Determination of MK-0431 in human plasma using high turbulence liquid chromatography online extraction and tandem mass spectrometry. *Rapid commun. mass spectrum.* 20: 1169-1175. DOI: 10.1002/rcm.2426
9. Liu D, Arison B, Stearns R, Kim D, Vincent S (2007) . Characterization of two cyclic metabolites of sitagliptina. *Drug Metab. Dispos.* 35: 521-524. DOI: 10.1124/dmd.106.013128

10. Bergman A, Stevens C, Zhou Y, Yi B, Laethem M, Smet M, Synder K, Hilliard D, Tanaka W, Zeng W, Tanen M, Wang A, Chen L, Winchell G, Davies M, Ramael S, Wagner J, Herman G (2006). Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of multiple oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor: A double-blind, randomized, placebo-controlled study in healthy male volunteers. *Clin. Ther.* 28 : 55–72. DOI:10.1016/j.clinthera.2006.01.015
11. Herman G, Stevens C, Dyck K, Bergman A, Yi B, Smet M, Synder K, Hilliard D, Tanen M, Tanaka W, Wang A, Zeng W, Musson D, Winchell G, Davies M, Ramael S, Gottesdiener K, Wagner J (2005). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of sitagliptin, an inhibitor of dipeptidyl peptidase IV, in healthy subjects: results from two randomized, double-blind, placebo-controlled studies with single oral doses. *Clin. Pharm. Ther.* 78: 675–688. DOI: 10.1016/j.clpt.2005.09.002.
12. International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use (2005) Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)
13. USP. The united States Pharmacopeia 29 ed. Rockville, United States Convention, 2006.
14. USP. The united States Pharmacopeia 31 ed. Rockville, United States Convention, 2009.

5.2 Artigo 2

Development and Validation of an UV-spectrophotometric Method for the Dissolution Studies of Sitagliptin Tablets

Aline Ravanello¹, Gabriele Dadalt², Bruna G. S. Torres², Felipe K. Hurtado¹; Ana I. P.
Marcolino²; Clarice M. B. Rolim^{1,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia
Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),
Av. Roraima 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

² Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa
Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

* Corresponding author:

Clarice Madalena Bueno Rolim

Phone: +55 55 3220-8094; Fax: +55 55 3220-8248

E-mail address: crolim@smail.ufsm.br

Summary

A simple UV-spectrophotometric method was developed and validated for the analysis and dissolution studies of sitagliptin phosphate in tablets. Specificity test indicated an adequate UV detection at 267 nm. The method was validated regarding Specificity/accuracy/precision (RSD < 2%), linearity ($r^2 = 0.9999$), and partial robustness. Tablets uniformity was 102.52% (RSD = 2.54%). The method was applied for the determination of the drug in commercial tablet preparations and proved to be reliable for quantification. It was also used for the comparison of dissolution profiles of sitagliptin tablets. After dissolution tests comparing eight different conditions through dissolution efficiency (DE), the chosen condition for posterior tests was USP apparatus 1 (basket) in 0.01M HCl pH 3.0, at a stirring rate of 50 rpm. The methodology was applied to two batches of sitagliptin phosphate tablets, giving similar dissolution profiles compared by the difference and similarity factor, obtaining values within the specified limits.

Keywords: dissolution, sitagliptin, UV-spectrophotometry, validation.

Introduction

Sitagliptin is a potent, highly selective, competitive and reversible inhibitor of dipeptidyl peptidase-4 enzyme (DPP-4) (1, 2), which rapidly inactive incretin hormones released to bloodstream after the ingestion of a meal (3). Therefore, inhibiting DPP-4, sitagliptin increase glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose-dependent insulintropic peptide (GIP) levels, gut-derived peptides, called incretin hormones, extending its effects, especially the increasing of insulin release and reduction of glucagon secretion, making this drug an important alternative in the treatment of type 2 diabetes mellitus (4).

Dissolution test has emerged in the pharmaceutical field as a very important tool to characterize drug product performance (5). The importance of the test is based on the fact that for a drug to be absorbed and available to the systemic circulation, it must previously be solubilized. In vitro drug dissolution tests provide measurements of the bioavailability of a drug and can demonstrate bioequivalence from batch-to-batch, as well as are essential in the stages of formulation development, for screening and proper assessment of different formulations. Besides, dissolution is a requirement for regulatory approval for product marketing and is a vital component of the overall quality control program (6, 7).

Although there is a crescent number of works describing sitagliptin structure, pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical studies (8-12), this drug is not listed in any pharmacopoeia and there is no dissolution test for tablets reported in literature.

The method for quantification of sitagliptin phosphate in tablets used in this work was UV spectrophotometry, due to its quickness of analysis, precision of results and good specificity, besides the fact that it can use less quantity and any kind of solvents, depending on the solubility of the sample.

The aim of the present paper was to develop and validate an analytical procedure to evaluate sitagliptin phosphate tablet dosage forms, as well as develop and investigate a dissolution test for sitagliptin in tablet dosage form and validate a UV-spectrophotometric method to be applied for in vitro dissolution studies.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Sitagliptin phosphate (Figure 1) standard was purchased from Sequoia Research Products Ltd. with a declared purity of 99.5%. Januvia[®] tablets (Merck Sharp & Dohme S.p.A.) of 100 mg were purchased in a local pharmacy. The compounds used in the dissolution medium were HCl and sodium acetate buffer, purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and Vetec (Duque de Caxias, Brazil), respectively. All chemical products were of analytical grade. Ultra pure water was obtained from a Millipore filtration system. For the dissolution analysis, double-distilled water filtered through a 0.45 µm membrane filter was used.

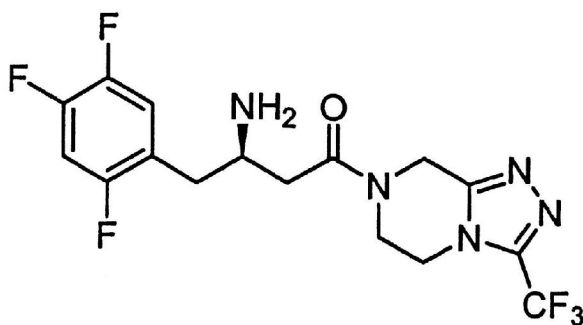


Figure 1 – chemical structure of sitagliptin

2.2. UV-spectrophotometric analysis

In the present work, UV-spectrophotometric analysis was carried out on a UV-1601PC Shimadzu spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan).

The standard solution of sitagliptin phosphate was prepared by dissolving 10 mg of reference standard in 10 ml of 0.01M HCl pH 3.0, obtaining a concentration of 1 mg ml⁻¹ from which six standard solutions in the range of 50-100 µg ml⁻¹ were prepared by appropriate dilution with 0.01M HCl pH 3.0.

The method was validated according to the ICH Guidelines (13). These tests included determination of linearity, accuracy, precision, robustness, limit of detection, limit of quantification and specificity.

2.3. Determination of sitagliptin phosphate content in tablets

Twenty Januvia[®] tablets of 100 mg were weighed, combined and thoroughly crushed. An amount of tablet powder equivalent to 10 mg of sitagliptin was accurately weighed and transferred to a 100 ml volumetric flask, made up to volume with 0.01M HCl pH 3.0 and an aliquot of about 10 ml of this suspension was centrifuged at 2870 x g for 10 minutes. Centrifugation method was chosen in order to avoid a possible interference of tablets excipients in the sample absorbance. After centrifugation, solution was diluted with 0.01M HCl pH 3.0 to obtain a concentration of about 80 µg ml⁻¹. The uniformity of content of the dosage units was determined by placing a whole tablet of 100 mg in ten separate 100 ml volumetric flask. The volume was made to mark with 0.01M HCl pH 3.0 and centrifuged at 2870 x g for 10 minutes. After centrifugation, solutions were diluted with 0.01M HCl pH 3.0

to obtain a concentration of about $80 \mu\text{g ml}^{-1}$. The drug concentration was determined in triplicate by UV-spectrophotometry, and calculated with a calibration curve.

2.4. *In vitro* dissolution studies

The dissolution test was performed in a Pharma Test multi-bath ($n = 6$) dissolution system (Hamburg, Germany). The quantity of dissolved drug was determined using the following parameters, totalizing eight conditions (Table 1): apparatus I (basket), apparatus II (paddle), medium distilled water, 0.01M HCl pH 3.0 solution and pH 4.5 acetate buffer, and stirring rates of 50 and 75 rpm. The volume of medium was 900 ml and the temperature was $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Dissolution tests were determined for six tablets for each condition. At predetermined time intervals (0, 5, 10, 15, 20, 30, 45 and 60 minutes), an exact volume of sample was withdrawn from each vessel and immediately replaced by an identical volume of fresh medium. The concentrations of sitagliptin in all the dissolution conditions were determined by the proposed UV-spectrophotometric method.

Table 1 – Tested conditions in the development of dissolution profiles of sitagliptin phosphate tablets.

Condition	Apparatus	Medium (900 mL)	Stirring rate (rpm)
I	1 (basket)	Distilled water	50
II	2 (paddle)	Distilled water	50
III	1 (basket)	0.01 M HCl pH 3.0	50
IV	2 (paddle)	0.01 M HCl pH 3.0	50
V	1 (basket)	0.01 M HCl pH 3.0	75
VI	2 (paddle)	0.01 M HCl pH 3.0	75
VII	1 (basket)	Acetate buffer pH 4.5	50
VIII	2 (paddle)	Acetate buffer pH 4.5	50

The dissolution profiles obtained using the eight conditions were compared by calculation of the dissolution efficiency (DE) and assessed by analysis of variance (ANOVA), expressed as a percentage of the absorbance of the rectangle described by 100% dissolution in the same time (14).

Dissolution profiles for twelve tablets of Januvia[®] using the chosen condition were performed with two different batches and were compared by the model-independent simple method which includes the difference factor (f_1) and the similarity factor (f_2). The f_1 factor measures the percentage error between two curves over all time points and the f_2 factor is a logarithmic transformation of the sum-squared error of differences between the test and the reference products over all time points (15, 16). The f_1 and f_2 values must be within 0-15 and 50-100, respectively, for the dissolution profiles be similar.

Validation of *in vitro* dissolution studies was carried out by determining specificity, precision and accuracy of the method. Specificity was determined by the dissolution of simulated sample excipients (SSE) using the condition III for 60 minutes. Samples were centrifuged and analyzed by UV-spectrophotometry. The precision of the method was analyzed through dissolution of six tablets of the same batch, in the same day and in a second day, using condition III for 60 minutes. The mean values and the relative standard deviation were calculated and the results were statistically compared. Accuracy of the method was determined by weighting the equivalent of 45, 80 and 100% of sitagliptin from the crushed tablets and submitted to dissolution for 60 minutes, using condition III. It was calculated the theoretical amount of sitagliptin in each sample and compared to obtained amount through absorbances.

3. Results and Discussion

3.1. Method validation

Calibration curves for sitagliptin were constructed by plotting absorbance *versus* concentration (50.0 – 100.0 µg ml⁻¹ range). Linear regression by the least squares method was then applied. The calculated value for the correlation coefficient ($r^2 = 0.9999$) showed excellent linearity of the calibration curve for the method (RSD < 2.0).

The specificity was determined by the absorption spectrum of a simulated sample excipients (SSE) solution, compared with the absorption spectrum of sitagliptin and is shown in Figure 2. Absorbance of SSE was determined to be 0.0043 at 267 nm, thus achieving good selectivity towards any potential interference from the formulation.

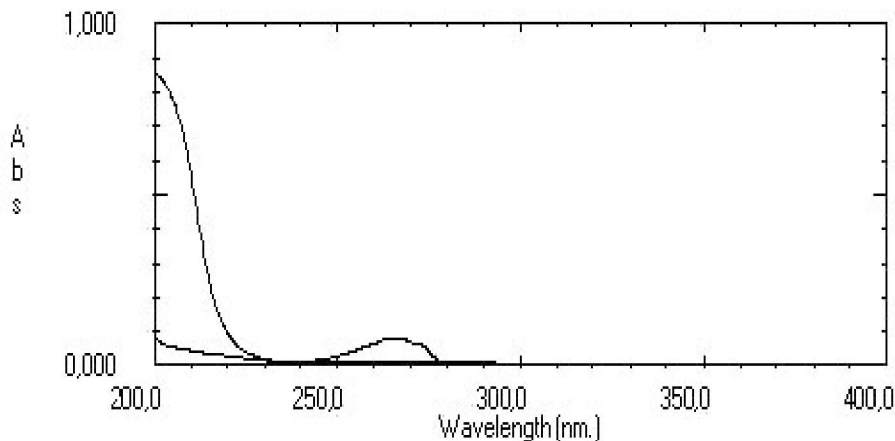


Figure 2 - Absorption spectrum of sitagliptin phosphate (chosen wavelength indicated by the arrow, 267 nm) and of simulated sample excipients (SSE), demonstrating minimum interference and good specificity of the quantification and of the dissolution method.

Repeatability (intra-day precision) was studied by calculating the relative standard deviation (RSD) for six determinations of the concentration of $80 \mu\text{g ml}^{-1}$, performed on the same day and under the same experimental conditions. The results of sitagliptin determinations of the working standard solutions with the calculated RSD values are shown in Table 2.

Intermediate precision includes the estimation of variations in analysis when a method is used within laboratories, on different days (inter-day precision), by different analysts, and on different equipment. The inter-day precision was assessed by analyzing two standard solutions on three different days, and the RSD values obtained were 0.98 and 0.93%. Between-analyst precision was determined by calculating the RSD for the analysis of three standard solutions by two analysts; the RSD values were found to be 1.81, 1.90 and 2.68%. The results are presented in Table 2.

Table 2- Intra-day, inter-day and inter-analyst precision data of UV-spectrophotometry for sitagliptin phosphate

Theoretical amount ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Intra-day		Inter-day			Inter-analyst		
	Experimental amount (%)	RSD (%)	Sample	Mean (%)	RSD (%)	Sample	Mean (%)	RSD (%)
80.0	101.01	1.81	1	95.49	0.98	1	101.01	1.81
			2	97.96	0.93	2	96.10	1.90
						3	101.37	2.68

The accuracy of an analytical method is the closeness of the test results obtained by the method to the true value. The accuracy was assessed from five replicate determinations of three concentration levels: 75, 80 and $85 \mu\text{g ml}^{-1}$. This narrow range was chosen because it is the critical interval in which the concentration of the sample would be at most of the time.

The absolute means obtained were 99.31, 101.04 and 101.34%, respectively, with a mean value of 100.56% and RSD of 1.09% as shown in Table 3, and it is evident that the method is accurate within the desired range.

Table 3 - Accuracy expressed as percentage of known concentration at three levels of sitagliptin

Theoretical amount ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Experimental amount ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Accuracy (%)	RSD (%)
75	79.45 (105.93%)		
80	80.83 (101.04%)	100.56	1.09
85	81.07 (95.38%)		

The robustness was determined by analyzing the same sample under a variety of conditions. The factors considered were: variations in pH of HCl 0.01M solution and in wavelength of determination of absorbance. The results and the experimental range of the selected variables are given in Table 4, together with the optimized values. There were no significant changes in the absorbance values when modifications in pH of HCl 0.01M solution and when the wavelength are change to 268nm and 266 nm. The results demonstrate that the method is robust.

Table 4- UV-spectrophotometric conditions and range investigated during robustness testing

Variable	Range investigated	Sitagliptin (%)	Optimized value
pH of HCl 0.01M solution	2.8	97.91	
	3.0	98.85	3.0
	3.2	100.41	
Wavelength (nm)	266	97.90	
	267	98.85	267
	268	96.75	

The limit of quantification (LOQ) and the limit of detection (LOD) were obtained from the slope and the standard deviation of the intercept from three calibration curves determined by a linear regression line as defined by ICH. The LOQ and the LOD were found to be 16 and 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively.

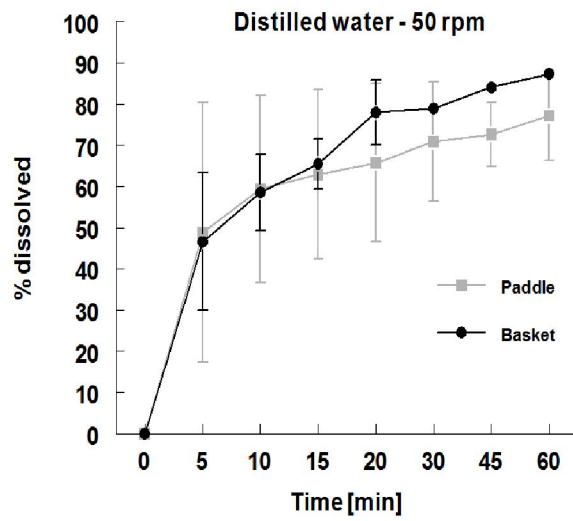
3.2. Uniformity of sitagliptin phosphate in tablets

The uniformity of sitagliptin phosphate tablets was calculated as an average of three determinations by UV-spectrophotometry using ten tablets for each determination. The result obtained was in agreement with the specifications. Tablets uniformity was 102.52% (RSD = 2.54%).

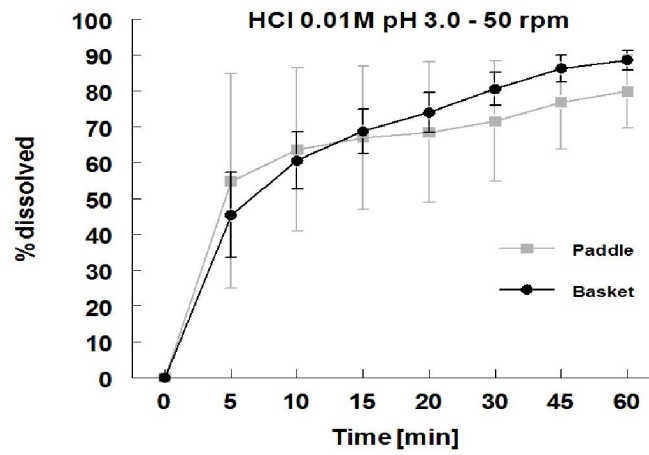
3.3. *In vitro* dissolution studies

The drug release profile curves obtained by plotting the percentage of drug released against time in the different conditions are showed in Figure 3. The observation of the dissolution profiles shows that apparatus 2 (paddle) gave the greater relative standard deviations, and mostly were out of maximum limits allowed for each time of collect. A possible explanation for this to occur is the homogeneity of the medium during the dissolution test, since the basket provided a more homogeneous medium because the excipients were retained in the basket.

A



B



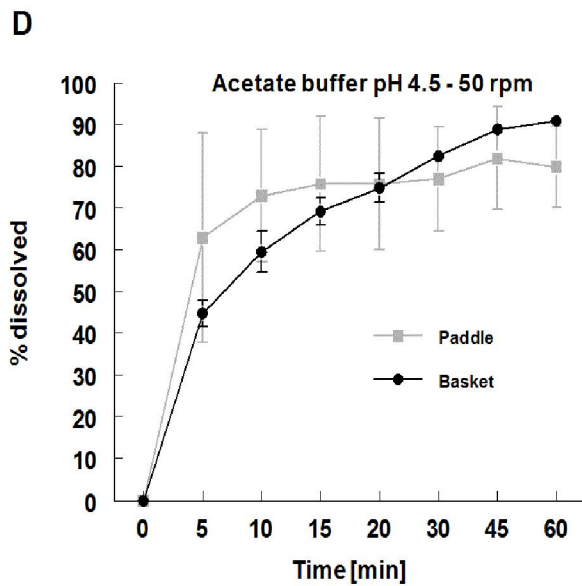
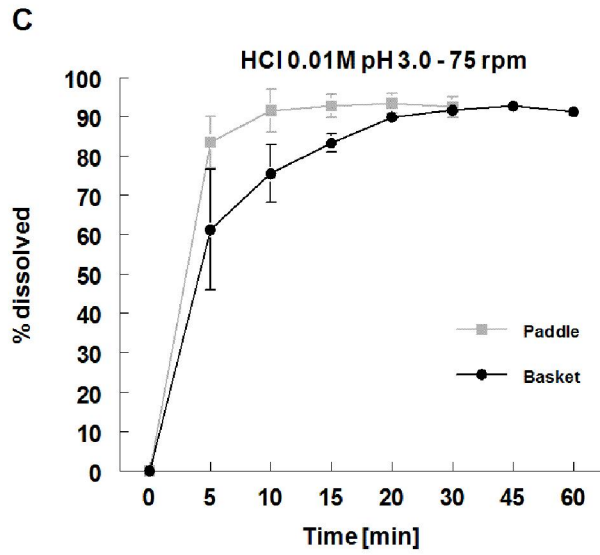


Figure 3 - Dissolution profiles of sitagliptin in all tested conditions. A – Conditions I and II, medium distilled water and stirring rate of 50 rpm. B – Conditions III and IV, medium 0.01M HCl pH 3.0 and stirring rate of 50 rpm. C – Conditions V and VI, medium 0.01M HCl pH 3.0 and stirring rate of 75 rpm. D – Conditions VII and VIII, medium acetate buffer pH 4.5 and stirring rate of 50 rpm.

The results of dissolution efficiency (DE) were statistically compared using analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's post-hoc test in order to verify influence of each variable of conditions on results of DE and is showed in Table 5. Apparatus influenced DE, since conditions involving the paddle as the stirring resource reached lower DE than that using the basket. Conditions using 75 rpm as stirring rate obtained greater values of DE, dissolving more rapidly than the other conditions, as expected. There was no significant differences in the DE values between medium distilled water and acetate buffer, however conditions using 0.01M HCl pH 3.0 obtained the greater values of DE, including without consider stirring rates of 75 rpm.

Table 5 - Comparison among dissolution tests of sitagliptin tablets through dissolution efficiency

Condition	DE% (Mean ± SD)
I	71.16 ± 2.14
II	65.89 ± 8.37
III	77.95 ± 5.38
IV	71.68 ± 9.04
V	83.94 ± 1.53
VI	83.68 ± 2.41
VII	74.57 ± 1.28
VIII	68.88 ± 9.78

Condition III was the chosen for posterior tests, because of the following factors: medium of dissolution, considering that HCl simulates the gastrointestinal tract medium; stirring rate, since in lower values of agitation dissolution occurs more slowly, fulfilling the specifications for the application of the test of similarity between formulations; and the apparatus, because basket provided greater homogeneity among the samples.

Dissolution profile for twelve tablets of sitagliptin of two different batches was performed using condition III, because it showed the necessary requirements to apply f -factors. Similarity test resulted in values between 2.82 and 4.86 for f_1 (difference factor) and between 72.88 and 89.47 for f_2 (similarity factor), confirming the reliability of the proposed method.

The specificity of the dissolution test was determined by the absorption spectrum of simulated sample excipients (SSE) dissolved in the same conditions as for tablets, using condition III, for 60 minutes, and the result is shown in Figure 2. As can be seen, absorption spectrum of SSE dissolved is superimposed to that of SSE 0.01M HCl pH 3.0 solution, showing that neither dissolution of formulation interfere in the absorption of sitagliptin phosphate.

Precision data of dissolution studies, using two batches of sitagliptin phosphate tablets in two different days resulted in values among 88.08 and 93.17 of mean of dissolved percentage and 2.23 and 5.73 of relative standard deviation. ANOVA showed no significant differences among the means of each day for each batch, demonstrating the repeatability of the proposed method.

Recovery test of sitagliptin was made to evaluate the accuracy of the dissolution method. Recovery percentage mean was 95.39 ± 9.79 and, considering that accepted values for accuracy are means of 95-105% (17), it can be concluded that the proposed method fulfill this validation requisite.

4. Conclusions

The data validation showed that the UV-spectrophotometric method is accurate and possess excellent linearity and precision characteristics. This method gives quickness of analysis and showed no need of use of organic solvents, besides the fact that it allowed the quantification of sitagliptin without any significant interference from excipients, being used successfully for monitoring its concentration for *in vitro* dissolution profile studies of solid pharmaceutical dosage forms. Analysis of ANOVA showed differences among each condition tested, which was important to choose the best condition to following with the other tests. Condition III was chosen because of its medium, homogeneity of results and possibility to apply the f-factors. The dissolution method showed to be reliable also because of its comparison between two batches of sitagliptin tablets, through similarity test of f_1 and f_2 factors. Validation of dissolution method was made using the specificity, precision and accuracy parameters, which gave great results, demonstrating again the trustful of the method. Thus, dissolution testing is useful for batch-to-batch comparison. The need for control of dissolution in drug production is indispensable and ensures quality. The method described is shown to be useful for routine quality control analysis and dissolution studies of sitagliptin phosphate tablet formulations.

5. Acknowledgments

The authors wish to thank FAPERGS for financial support.

6. References

- (1) Kim, D., L. Wang, M. Beconi, G.J. Eiermann, M.H. Fisher, H. He, G.J. Hickey, J.E. Kowalchick, B. Leiting, K. Lyons, F. Marsilio, M.E. McCann, R.A. Patel, A. Petrov, G. Scapin, S.B. Patel, R.S. Roy, J.K. Wu, M.J. Wyvratt, B.B. Zhang, L. Zhu, N.A. Thornberry & A.E. Weber (2005) *J. Med. Chem.* **48**: 141-151.
- (2) Herman G.A., A. Bergman, C. Stevens, P. Kotey, B. Yi, P. Zhao, B. Dietrich, G. Golor, A. Schrodter, B. Keymeulen, K.C. Lasseter, M.S. Kipnes, K. Snyder, D. Hilliard, M. Tanen, C. Cilissen, M. De Smet, I. Lepeleire, K. Van Dyck, A.Q. Wang, W. Zeng, M.J. Davies, W. Tanaka, J.J. Holst, C.F. Deacon, K.M. Gottesdiener & J.A. Wagner (2006) *J. Clin. Endocr. Metab.* **91**: 4612-4619.
- (3) Holst J.J. & C.F. Deacon (1998) *Diabetes* **47**: 1663-1670.
- (4) Holst J.J. & J. Gromada (2004) *Am. J. Physiol.* **287**: E199-E206.
- (5) Furlanetto S., F. Maestrelli, S. Orlandini, S. Pinzauti & P. Mura (2003) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **32**: 159 -165.
- (6) Frost S.M.A. (2004) *Dissolut. Technol.* **11**: 19–21.
- (7) Ansel H., Jr.L. Allen & N. Popovich (1999) in “Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems”, (Lippincott Williams & Wilkins, eds.), Baltimore, 238-239.
- (8) Havale S.H. & M. Pal (2009) *Bioorgan. Med. Chem.* **17**: 1783-1802.

- (9) Biftu T., G. Scapin, S. Singh, D. Feng, J.W. Becker, G. Eiermann, H. He, K. Lyons, S. Patel, A. Petrov, R. Sinha-Roy, B. Zhang, J. Wu, X. Zhang, G.A. Doss, N.A. Thornberry & A.E. Weber (2007) *Bioorg Med Chem Lett* **17**: 3384-3387.
- (10) Zerilli T. & E.Y. Pyon (2007) *New Drug* **29**: 2614-2634.
- (11) McIntosh C.H.S., H. Demuth, S. Kim, J.A. Pospisilik & R.A. Pederson (2006) Applications of dipeptidyl peptidase IV inhibitors in diabetes mellitus. *Int. J. Biochem. Cell. B.* **38**: 860-872.
- (12) Bergman A.J., C. Stevens, Y.Y. Zhou, B. Yi, M. Laethem, M. De Smet, K. Snyder, D. Hilliarcl, W. Tanaka, W. Zeng, M. Tanen, A.Q. Wang, L. Chen, G. Winchell, M.J. Davies, S. Ramael, J.A. Wagner, & G.A. Herman (2006) *Clin. Ther.* **28**: 55-72.
- (13) ICH-Q2B, Guidance for Industry: ICH-Q2B. Validation of Analytical Procedures: Methodology (2005) Food and Drug Administration, Rockville, MD.
- (14) Khan K.A. (1975) *J. Pharm. Pharmacol.* **28**: 48-49.
- (15) Costa P. & J.M.S. Lobo (2001) *Eur. J. Pharm. Sci.* **13**: 123-133.
- (16) Moore J.W. & H.H. Flanner (1996) *Pharm. Technol.* **20**: 64-74.
- (17) Marques, M.R.C. & W. Brown (2002) *Rev. Anal.* **1**: 48-51.

6 DISCUSSÃO

6.1 Discussão Geral

Embora a sitagliptina represente um fármaco de grande importância no tratamento de pacientes diabéticos, não existem até o presente momento monografias para as formulações de comprimidos que comprovem a qualidade do fármaco. Em virtude do exposto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar diferentes métodos possibilitando desta maneira a execução independente da condição do laboratório. A validação do método por espectrofotometria na região do UV permitiu uma determinação qualitativa e quantitativa com baixo custo e de maneira rápida, facilitando a rotina de análises para os comprimidos de sitagliptina. O método desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência embora tenha um custo um pouco mais elevado e a necessidade de analistas qualificados, possui uma maior especificidade, permitindo a avaliação de possíveis interferentes. Os estudos de degradação forçada realizados permitiram um maior conhecimento em relação à estabilidade do fármaco e também as prováveis condições de degradação.

6.2 Método Espectrofotométrico

A espectrofotometria na região do ultravioleta, por ser um método fácil, rápido e de custo relativamente baixo, tem sido amplamente utilizada para a quantificação de fármacos (CLURCZAK, 1998). Devido à falta de relatos na literatura de métodos espectrofotométricos validados para a determinação de fosfato de sitagliptina, desenvolveu-se método espectrofotométrico para a determinação de sitagliptina em comprimidos revestidos com a intenção de utilização nos estudos de dissolução.

Muitos solventes estão disponíveis para análise na região do ultravioleta e a escolha destes deve ser baseada na solubilidade da substância a ser analisada. Avaliou-se a solubilidade do fosfato de sitagliptina em HCl 0.01M, água purificada e tampão acetato pH 4.5, devido as informações contidas na literatura do fornecedor (MSD, 2007). Todos os

resultados foram satisfatórios, mas verificou-se um menor coeficiente de variação quando o solvente utilizado foi a solução de HCl 0.01M, sendo desta maneira o solvente escolhido.

Não foram observadas interferências devido aos excipientes, solventes ou outras impurezas nas condições otimizadas. A especificidade do método foi avaliada através da pesquisa da possível interferência dos excipientes contidos nos comprimidos. De acordo com os espectros obtidos para a substância química de referência e para a amostra simulada de excipientes (ASE), constatou-se que o método foi específico.

Os resultados obtidos na avaliação da linearidade demonstraram que as soluções de sitagliptina SQR apresentaram correlação linear entre as absorvâncias e concentrações, nos intervalos utilizados. Gráficos de concentração versus absorvância foram plotados, os quais demonstraram haver linearidade adequada nas faixas de 50 a 100 µg/mL. A equação da reta para o método foi: $y = 0,0037x + 0,004$ com coeficiente de correlação de 0,9999. A análise de variância (ANOVA) realizada com as três curvas de linearidade obtidas em diferentes dias demonstra que a regressão linear é significativa e que não há desvio da linearidade ($P < 0.05$).

A precisão do método analítico foi demonstrada através da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (inter-dias). Os valores experimentais obtidos para a determinação de sitagliptina em comprimidos, no mesmo dia e sob as mesmas condições, demonstraram que o método foi preciso, já que os coeficientes de variação ficaram abaixo de 2%. Os resultados da precisão inter-dias foram analisados através da ANOVA, a qual demonstrou não haver diferença significativa entre os valores obtidos nos diferentes dias.

A exatidão do método proposto foi determinada através do teste de recuperação da sitagliptina SQR em HCl 0.01M. A percentagem de recuperação média obtida foi de 100.56% demonstrando boa exatidão para o método, uma vez que ficaram dentro dos limites de 95-105%.

A robustez do método foi avaliada quanto ao comprimento de onda e ao pH. Na mudança de ambos os parâmetros o método demonstrou ser robusto.

A sensibilidade do método cromatográfico foi avaliada através da determinação dos limites de quantificação e detecção de sitagliptina no sistema empregado. Os valores obtidos para LQ e LD de acordo com o cálculo foram de 16 µg/ml e 5 µg/ml respectivamente, indicando boa sensibilidade para o método.

O método espectrofotométrico proposto mostrou-se adequado, apresentando simplicidade, especificidade, linearidade, precisão e exatidão, podendo ser empregado para o controle de qualidade de sitagliptina em comprimidos.

6.3 Método Cromatográfico

Por ser uma técnica bastante versátil, a cromatografia líquida tem sido muito utilizada em laboratórios de análise para determinação qualitativa e quantitativa de fármacos em matérias-primas, produtos acabados e amostras biológicas. A separação e quantificação de diferentes componentes em uma formulação podem ser realizadas através da adequada escolha de alguns parâmetros, como coluna analítica, composição e proporção das fases móveis, e método de detecção. Pelo fato de haver a necessidade em cromatografia líquida, do uso de equipamentos e reagentes de maior custo, acaba ocorrendo uma certa limitação para o uso desta técnica por alguns laboratórios de controle de qualidade de medicamentos (SWARTZ & KRULL, 1998; SKOOG, HOOLLER & NIMAN, 2002).

No desenvolvimento do método proposto às condições cromatográficas foram influenciadas pelas propriedades físico-químicas do fosfato de sitagliptina, tais como a polaridade e a solubilidade. A sitagliptina é solúvel em água e, portanto possui um caráter polar.

Durante o desenvolvimento do método foram realizados testes utilizando diferentes fases móveis, como por exemplo: acetonitrila: água; metanol: água; metanol: ác. Ortofosfórico; solução trietilamina 0.1%: acetonitrila; Ac acético 1.25%: acetonitrila; ác. ortofosfórico 0.025M: acetonitrila. A fase móvel constituída de tampão fosfato pH 6.8: acetonitrila mostrou-se adequada, mostrando um tempo de retenção reprodutível de aproximadamente 3.6 minutos, boa eficiência (pratos teóricos > 4000), com picos de boa resolução, seletividade e simetria (< 2%).

Para avaliar a especificidade do método, a sitagliptina SQR foi submetida á degradação forçada em meio ácido, alcalino, fotolítico e oxidativo. Na oxidação química com H₂O₂ 5%, por 24 horas, a percentagem de degradação foi de 44%, e mesmo com o surgimento de vários picos adicionais o pico referente ao fosfato de sitagliptina permaneceu bem definido

e com um teor de pureza de 99.99%. Frente à luz a SQR sofreu um grande decréscimo, restando 62% do valor da área em apenas 20 minutos, ocorrendo à formação de produtos de degradação, porém o pico referente à SQR manteve grau de pureza elevado (99.98%). Na hidrólise ácida, após 4 horas a SQR sofreu a menor degradação, quando comparada as outras condições. A percentagem de degradação foi de 12% e sem variação significativa no tempo de retenção, apresentando um teor de pureza de 100% e bem definido. Na hidrólise alcalina em 4 horas houve 100% de degradação da SQR e a formação de picos adicionais até 11 minutos.

Na avaliação dos resultados obtidos através das curvas de linearidade, realizada através de ANOVA, pode-se observar que há regressão linear significativa e não houve desvio na linearidade para as curvas produzidas em diferentes dias ($P < 0.05$). A faixa de concentração linear foi de 25-75 $\mu\text{g/mL}$. A equação da reta para o método proposto foi: $y = 5227.5x + 10854$, com coeficiente de correlação de 0.9999.

A precisão do método foi demonstrada através da repetibilidade (intra-dia) e precisão intermediária (entre-dias). O coeficiente de variação obtidos para a determinação de sitagliptina, no mesmo dia e nas mesmas condições foi 0.61%. Já os valores de precisão intermediária apresentaram um coeficiente de variação de 1.16%. Foi realizada ANOVA para os valores de precisão dos três diferentes dias, a qual demonstrou não haver diferença significativa para os ensaios realizados ($< 2\%$).

A exatidão do método foi determinada através do teste de recuperação da sitagliptina SQR. O valor médio de recuperação foi de 100.06% com coeficiente de variação de 1.67%. Os resultados encontrados demonstraram boa exatidão do método.

A sensibilidade do método foi avaliada através dos cálculos do limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). Os valores obtidos foram: 2.1 $\mu\text{g/ml}$ e 6.4 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Os valores de LOD e LOQ indicam boa sensibilidade do método.

O método proposto ainda foi analisado quanto a sua robustez através de pequenas modificações nas condições cromatográficas propostas. Os valores médios obtidos para a determinação de sitagliptina em comprimidos realizando as modificações nas condições cromatográficas foram analisados por ANOVA, a qual demonstrou não haver diferença significativa entre as análises realizadas.

O método desenvolvido demonstrou ser adequado para a determinação de fosfato de sitagliptina em comprimidos apresentando especificidade, linearidade, precisão e exatidão, podendo ser empregado para o controle de qualidade.

6.4 Análise comparativa entre os dois métodos validados

No presente trabalho, foram desenvolvidos e validados dois métodos: espectrofotometria na região do ultravioleta e cromatografia líquida. Os métodos propostos foram selecionados em função de suas características, a espectrofotometria na região do ultravioleta foi um dos métodos selecionados por ser rápida, de fácil execução e com baixo custo. Embora a cromatografia líquida tenha um custo mais elevado e necessite de um analista bem treinado, ela apresentou resultados precisos e exatos em um curto tempo de análise. Os resultados obtidos com os métodos por cromatografia líquida e por espectrofotometria no ultravioleta foram comparados estatisticamente por ANOVA e estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Análise de variância dos teores obtidos na determinação do fosfato de sitagliptina em comprimidos por espectrofotometria no ultravioleta e cromatografia líquida.

Fontes de Variação	GL	Soma dos Quadrados	Variância	F*
Entre métodos	1	7.304	0.416	7.05 (7.70)
Resíduo	4	4.143	1.655	
Total	5	11.447		

*Valores entre parênteses correspondem aos valores críticos de F para P = 0.05.

Em virtude dos resultados obtidos através desta comparação, pode-se verificar que os métodos demonstraram ser intercambiáveis e adequados para o controle de qualidade da

sitagliptina em comprimidos. Estes podem ser utilizados para determinação quantitativa, teste de uniformidade de conteúdo e como técnicas de identificação da substância referida.

6.5 Dissolução

Os resultados obtidos demonstraram que as soluções de fosfato de sitagliptina SQR apresentaram correlação linear entre as respostas (absorbâncias) as concentrações, nos intervalos utilizados. Gráficos de concentração versus resposta (absorbância) foram plotados e mostraram linearidade adequada. As equações da reta para os métodos foram: $y = 0.0037x + 0.004$, para HCl 0.01 M e $y = 0.0037x - 0.0059$ para água purificada, com coeficientes de correlação de 0.9998 e 0.9999, respectivamente. As análises de variância (ANOVA) efetuadas sobre os valores de absorbâncias das curvas de calibração em HCl 0.01 M e água purificada de fosfato de sitagliptina, demonstraram regressões lineares significativas, não havendo desvios da linearidade.

A precisão do método foi avaliada utilizando-se diferentes lotes e em diferentes dias. Os valores obtidos para o coeficiente de correlação ficaram entre 2.23% à 5.73%. A análise de variância indicou não haver diferença significativa entre as análises realizadas nos diferentes dias e lotes analisados.

O resultado obtido no teste de recuperação de fosfato de sitagliptina para avaliação da exatidão do método de dissolução corresponde à percentagem média obtida por espectrofotometria no ultravioleta de 95.39 com um coeficiente de variação inferior a 2%. O resultado obtido pelo método proposto demonstra que este é exato dentro do intervalo avaliado.

Muitas monografias oficiais estabelecem que não menos que 75% do fármaco deve estar dissolvido em 45 minutos (MARCOLONGO, 2003). As farmacopéias Americana, Britânica e Brasileira preconizam que não menos que 75% do fármaco deve estar dissolvido em 45 minutos. Para fármacos altamente solúveis uma especificação de um único ponto, com 85% dissolvidos em 60 minutos ou menos, é suficiente como teste de controle de qualidade lote a lote (FDA, 1997).

Com base nos fatos expostos, sugere-se como especificação para o fosfato de sitagliptina em comprimidos, 85% de dissolução de fármaco dissolvido em 60 minutos, em HCl 0,01M.

7. CONCLUSÕES

- As análises espectroscópicas (RMN ^1H , ^{13}C e UV) permitiram a caracterização da substância química utilizada como referência no presente estudo;
- O método desenvolvido através da espectrofotometria na região do ultravioleta a 267nm, utilizando HCl 0.01M, mostrou-se sensível, linear, preciso, exato e específico para a determinação quantitativa de sitagliptina em comprimidos.
- O método por cromatografia líquida, utilizando coluna C18, fase móvel constituída de tampão fosfato pH 6.8: acetonitrila e fluxo de 0,8ml/min, demonstrou precisão, sensibilidade, especificidade, exatidão e robustez para a análise quantitativa de sitagliptina em comprimidos.
- A análise comparativa entre os métodos propostos para a determinação quantitativa da sitagliptina demonstrou não haver diferença estatística significativa entre eles, sendo caracterizada a equivalência entre os mesmos.
- O uso de 900 mL de HCl 0.01M a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, aparato cesta, com velocidade de 50 rpm, demonstraram resultados satisfatórios para análise da dissolução de comprimidos contendo fosfato de sitagliptina.
- Sugere-se que a especificação de 85% de dissolução em 60 minutos seja suficiente para avaliar a % dissolvida de sitagliptina em comprimidos.

- O método por espectrofotométrico mostrou-se adequado para avaliar a % dissolvida de sitagliptina, não apresentando interferentes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOU, H.M. **Dissolution, bioavailability and bioequivalence**. Easton: Mack Printing, 1989. 554p.

ADMS, E.; DE MAESSCHALCK, R.; DE SPIEGELLER; et al. Evaluation of dissolution profiles using principal component analysis, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 212, n. 1, p. 41-53, 2001. .

AHREN, B.; LANDIN, O. M.; JANSSON, P. A.; et al. Inhibitor of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 5, p. 2078-94, 2004.

ANSARI, M.; KAZEMIPOUR, M.; TALEBNIA, J. The Development and Validation of a Dissolution Method for Clomipramine Solid Dosage Forms. **Dissolution Technologies**, v. 11, p. 16-24, 2004.

ARANCIBIA, A. Calidad biofarmacéutica estudios *in vitro* e *in vivo*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.10, n.2, 123-33, 1991.

BAGGIO, L.; DRUKER, D. J. Glucagon like peptide-1 and glucagon like peptide-2. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 18, n. 4, p. 531-54, 2004.

BECONI, M. G.; REED, J. R.; TEFFERA, Y.; et al. Disposition of the dipeptidyl peptidase 4 inhibitor sitagliptin in rats and dogs. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 4, p. 525-32, 2007.

BERGMAN, A. J.; STEVENS, C.; YANYAN, Z.; et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of multiple oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor: A double-blind, randomized, placebo-controlled study in healthy male volunteers. **Clinical Therapeutics**, v. 28, n. 1, p. 55-72, 2006.

BERGMAN, A. J.; COTE, J.; YI, B.; et al. Effect of renal insufficiency on the pharmacokinetics of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor. **Diabetes Care**, v. 30, n. 7, p. 1862-64, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de Junho de 2003.

BRASIL. Agência Nacional de vigilância Sanitária. RE nº 310, de 01 de Setembro de 2004. Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 Set. 2004.

BRUBAKER, P.; DRUKER, D. J. Minireview: glucagon like peptides regulate cell proliferation and apoptosis in the pancreas, gut, and central nervous system. **Endocrinology**, v. 145, n. 6, p. 2653-59, 2004.

BRUCE, D. G.; DAVIS, W. A.; DAVIS, T. M. Longitudinal predictors of reduced mobility and physical disability in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 28, n. 10, p. 2441-47, 2005.

CHACRA, A. R.; LERARIO, D. D. G. Novos avanços na terapia do diabete tipo 2. **Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 8, n. 5, p. 914-22, 1998.

CHOWDARY, K. P. R.; RAJYALAKSHMI, Y. Dissolution rate in modern pharmacy. **East Pharmaceutical**, v. 30, n. 350, p. 51-4, 1987.

CLURCZAK, E. W. Validação de métodos em espectroscopia para análises farmacêuticas. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, n. 3, p. 22-28, 1998.

COHEN, A.; HORTON, E. S. Progress in the treatment of type 2 diabetes: new pharmacologic approaches to improve glycemic control. **Current Medical Research and opinion**, v. 23, n. 4, p. 905-17, 2007.

DEACON, C.F.; JOHNSEN, A. H.; HOLST, J. J. Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 80, n. 3, p. 952-57, 1995.

DHILLON, S. Sitagliptin: A Review of its Use in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus. **Drugs**, v. 70, n. 4, p. 489-512, 2010.

DRUKER, D. J.; NAUCK, M. A. The incretin system: Glucagon like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. **The Lancet**, v. 368, n. 9548, p. 1696 – 1705.

EMA, European Agency for the evaluation of Medicinal Products. Januvia, inn: sitagliptin. Disponível em: <http://www.emea.europa.eu/> acessado em 20 de Maio de 2008.

EMA, European Medicines Agency. Assessment report for Januvia. Disponível em: <http://www.emea.europa.eu/> acessado em 15 de Outubro de 2009.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4ª Ed. Atheneu. São Paulo, 1988

FDA – Food and Drug Administration: Guidance for Industry. Dissolution Testing of immediate Release Solid Oral Dosage Forms, US department of health and human services/Food and Drug administration/Center for drug evaluation and research, Rockville MD, 1997.

FORTUNATO, D. Dissolution Method Development for immediate Release Solid Oral Dosage Forms. **Dissolution Technologies**, v.12, n.3, p. 12-14, 2005.

GREGG, E. W.; BECKLES, G. L. A.; WILLIAMSON, D. E.; et al. Diabetes and physical disability among older U. S. adults. **Diabetes Care**, v. 23, n. 9, p. 1272-77, 2000.

GREGG, E. W.; MANGIONE, C. M.; CAULEY, J. A.; et al. Diabetes and incidence of functional disability in older women. **Diabetes care**, v. 25, n. 1, p. 61-67, 2002.

HANSEN, K. B.; HSIAO, Y.; XU, F. et al. Highly Efficient Asymmetric Synthesis of Sitagliptin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 25, p. 8798-8804, 2009.

HANSON, T.; BAGGIO, L.; DELMEIRE, D. et al. Double incretin receptor knockout mice reveal an essential role for the enteroinsular axis in transducing the glucoregulatory actions of DPP IV inhibitors. **Diabetes**, v. 53, n. 5, p. 1326-35, 2004.

HAVALE, S. H.; PALM, M. Medicinal chemistry approaches to the inhibition of dipeptidyl peptidase-4 for the treatment of type 2 diabetes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n.5, p. 1783-802, 2009.

HERMAN, G. A.; BERGMAN, A.; STEVENS, C.; et al. Effect of single oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on incretin and plasma glucose levels after an oral glucose tolerance test in patients with type 2 diabetes. **Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 91, n. 11, p. 4612-19, 2006.

HOLST, J. J.; GROMADA, J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. **American Journal of Physiology Endocrinology and metabolism**, v. 287, n. 2, p.199 – 06, 2004.

ICH – International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.

INZUCCHI, S. E. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review. **Journal of the American Medical Association**, v. 287, n. 3, p. 360-72, 2002.

KAPRIO, J.; TUOMILEHTO, J.; KOSKENVUO, M.; et al. Concordance for Type 1 (insulin-dependent) and Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based cohort of twins in Finland. **Diabetologia**, v. 35, n. 11, p. 1060-67, 1992.

KATZUNG, B. G. Hormônios pancreáticos e drogas antidiabéticas. **Farmacologia Básica & Clínica**. 5 ed. Rio de Janeiro: RJ, Guanabara Koogan S. A., 1994. cap 40, p. 440-451.

LIU, D. Q.; ARISON, B. H.; STEARNS, R. A.; et al. Characterization of two cyclic metabolites of sitagliptin. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 4, p. 521-4, 2007.

LOW, S. H., WONG, S. H., TANG, B. L. et al. Apical cell surface expression of rat dipeptidyl peptidase IV in transfected Madin–Darby canine kidney cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 20, p. 13391–96, 1991.

MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375-99, 2002.

MAGGI, S.; NOALE, M.; GALLINA, C. et al. Physical disability among older Italians with diabetes. **Diabetologia**, v. 47, n. 11, p. 1957-62, 2004.

MANUEL, D.; SCHULTZ, S. Health-related quality of life and health-adjusted life expectancy of people with diabetes mellitus in Ontario, Canada, 1996-1997. **Diabetes Care**, v. 27, n. 2, p. 407-14, 2004.

MARCOLONGO, R. **Dissolução de medicamentos:** fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica, 2003. 117f, Dissertação (mestrado em fármacos e medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003

MEIER, J. J.; NAUCK, M. A. Clinical endocrinology and metabolism. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide gastric inhibitory polypeptide. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 18, n. 4, p. 587-06, 2004.

MENTLEIN, R.; GALLWITZ, B.; SCHMIDT, W. E. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7–36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. **European Journal of Biochemistry**, v. 214, n. 3, p. 829-35, 1993.

MENTLEIN, R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26) - role in the inactivation of regulatory peptides. **Regulatory Peptides**, v. 85, n. 1, p. 9-24, 1999.

MIZUNO, C. S.; CHITTIBOYINA, A. G.; KURTZ, T. W.; et al. Type 2 diabetes and oral antihyperglycemic drugs. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 61-74, 2008.

MOLLER, D. E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 821-27, 2001.

MSD, Laboratórios Merck Sharp & Dohme. Circular aos médicos de januvia (fosfato de sitagliptina), Janeiro de 2007.

NATHAN, D. M.; BUSE, J. B.; DAVIDSON, M. B.; et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement for the American Diabetes Association and the European Association for the study of diabetes. **Diabetes Care**, v. 29, n. 8, p. 1963-72, 2006.

OBERLE, R.L.; CHEN, T. S; LLOYD, C. et al. The influence of the interdigestive migrating myoelectric complex on the gastric emptying liquids. **Gastroenterology**, v. 99, p. 1275-82, 1990.

PORTA, V.; YAMAMICHI, E.; STORPIRTIS, S. Avaliação biofarmacêutica *in vitro* de cápsulas de fluconazol. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.3, p. 333-43, 2002.

POSPISILIK, J. A.; STAFFORD, S. G.; DEMUTH, H. U.; et al. Long-term treatment with dipeptidyl peptidase IV inhibitor improves hepatic and peripheral insulin sensitivity in the VDF Zucker rat: a euglycemic-hyperinsulinemic clamp study. **Diabetes**, v. 51, n. 9, p. 2677-83, 2002.

RACHMAN, J.; BARROW B. A.; LEVY, J. C. et al. Near normalization of diurnal glucose concentrations by continuous of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in subjects with NIDDM. **Diabetologia**, v. 40, n. 2, p.205-11, 1997

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. O pâncreas endócrino e o controle da glicemia. **Farmacologia**, 5 ed. São Paulo: SP, Elsevier, 2003. cap 25, p. 440-449.

REIMER, M. K.; HOLST, J. J.; AHREN, B. Long-term inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves glucose tolerance and preserves islet function in mice. **European Journal of Endocrinology**, v. 146, n. 5, p. 717-27, 2002.

SEEMAN, T. E.; CHARPENTIER, P. A.; BERKMAN, L. F. et al. Predicting changes in physical performance in a high functioning elderly cohort: Macarthur studies of successful aging. **Journal of Gerontology**, v. 49, n. 3, p. 97-108, 1994.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. B. C.; **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 5 ed. New York: McGraw-Hill, 2005

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. Tradução Ignez Caracelli et al 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SKOUG, J. W.; HALSTEAD, G. W.; THEIS, D. L.; et al. Roteiro para desenvolvimento e validação do teste de dissolução em formas farmacêuticas sólidas para uso oral. **Pharmaceutical Technology**, v.1, n.1, p. 34-43, 1997.

STORPIRTIS, S. Biofarmacotécnica: fundamentos de biodisponibilidade, bioequivalência, dissolução e intercambialidade de medicamentos genéricos. São Paulo: s.n, p. 78, 1999.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v.2, n. 3, p.12-20, 1998.

TANG, Y.; LI, X.; WEN, N.; et al. RP-HPLC determination of sitagliptin phosphate. **Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 47, 2009.

USP – THE UNITED STATES PHARMACOPEIA 31 ed. Rokville, United States Convention, 2009.

VAN DER VEKEN, P.; HAEMERS, A.; AUGUSYNS, K. Prolyl peptidases related to dipeptidyl peptidase IV: Potential of specific inhibitors in drug discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 6, p . 621-35, 2007.

VISBOLL, T.; AGERSO, H.; KRARUP, T.; et al. Similar elimination rates of glucagon-like peptide-1 in obese type 2 diabetic patients and health subjects. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 1, p. 220-24, 2003.

ZENG W., MUSSON D. G., FISHER A. L., et al. Determination of MK-0431 in human plasma using high turbulence liquid chromatography online extraction and tandem mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 20, n. 8, p. 1169-75, 2006.

ZENG W., MUSSON D. G., FISHER A. L., et al. Determination of sitagliptina in human urine and hemodialysate using turbulent flow online extraction and tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 46, n. 3, p. 534-42, 2008.

WEBER, A. E. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of diabetes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 17, p. 4135-41, 2004.

WHO. World Health Organization. Diabetes. WHO fact sheet n. 312. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en>. Acessado em 21 de junho de 2007.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; et al. Global Prevalence of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-53, 2004.

9 ANEXOS

9.1 Artigo Aceito

Latin American Journal of Pharmacy - Answer to the Presentation of Manuscript

De:  **Latin American Journal of Pharmacy** (info@latamjpharm.org)

Enviada: sábado, 30 de janeiro de 2010 18:20:10

Para: Aline; Gabriele; Bruna; Felipe; Ana Isa; Clarice Ravanello; Dadalt; Torres; Hurtado; Marcolino; Rolim (alineravanello@hotmail.com); Aline; Gabriele; Bruna; Felipe; Ana Isa; Clarice Ravanello; Dadalt; Torres; Hurtado; Marcolino; Rolim (alineravanello@hotmail.com)

January 30th, 2010

Aline; Gabriele; Bruna; Felipe; Ana Isa; Clarice Ravanello; Dadalt; Torres; Hurtado; Marcolino; Rolim
Universidade Federal De Santa Maria (alineravanello@hotmail.com)

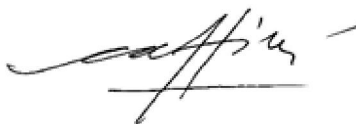
Manuscript Identification Number: LAJP 2041-09

Dear author:

I am glad to inform you that your article '**Development and Validation of an UV-spectrophotometric Method for the Dissolution Studies of Sitagliptin Tablets**' by *Aline Ravanello, Gabriele Dadalt, Bruna G. S. Torres, Felipe K. Hurtado; Ana I. P. Marcolino; Clarice M. B. Rolim* has been accepted for publication in Latin American Journal of Pharmacy. In due moment you will receive the page proof consigning the issue where your article will be included.

Many thanks for your interest in our journal.

Yours sincerely,



Prof. Néstor O. Caffini, Editor
Latin American Journal of Pharmacy
E-mail: caffini@biol.unlp.edu.ar

9.2 Artigo Submetido

Your manuscript entitled "Development and Validation of a Stability-Indicating LC Method for Determination of Sitagliptin in Tablets" has been submitted online and is presently being processed by the Journal of Chromatographic Science Editorial Offices.

Your manuscript ID is JCS-09-332.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when emailing or calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/jcs> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/jcs> .

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of Chromatographic Science.

Sincerely,

Michael Graves

--

Managing Editor

Journal of Chromatographic Science

Phone (847) 647-2900

Fax (847) 647-1155

<http://www.j-chrom-sci.com/>

<http://mc.manuscriptcentral.com/jcs>
